

Synthese eines homodet cyclischen Dodekapeptids
aus Glycin und L-Tyrosin
sowie Untersuchung seiner Rotationsdispersion
im Hinblick auf die Konformation von Cyclopeptiden

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Edith Bödefeld
aus Karlsruhe

1965

Synthese eines homodet cyclischen Dodekapeptids
aus Glycin und L-Tyrosin
sowie Untersuchung seiner Rotationsdispersion
im Hinblick auf die Konformation von Cyclopeptiden

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin



vorgelegt von

Edith B ö d e f e l d

aus Karlsruhe

1965

1. Referent: Prof. Dr. W. Broser
2. Referent: Prof. Dr. G. Manecke

Tag der Prüfung: 24. Mai 1965

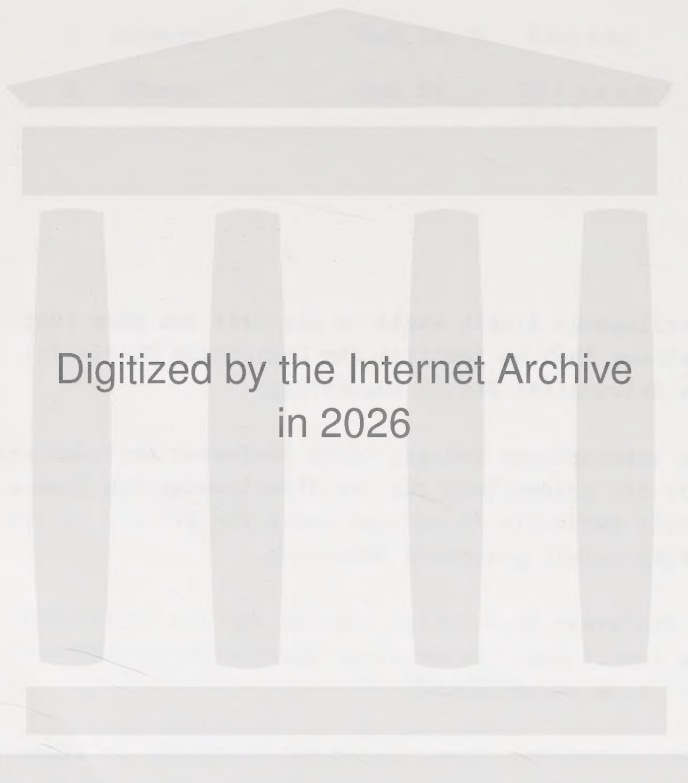
Tag der Promotion: 31. Juli 1965

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 1963 bis Februar 1965 am Institut für Organische Chemie der Freien Universität Berlin angefertigt.

Meinem verstorbenen Lehrer, Herrn Professor Dr.W.Lautsch, schulde ich großen Dank für die Ueberlassung des Themas, für viele wertvolle Anregungen sowie für die mir in jeder Beziehung zuteil gewordene Förderung.

Herrn Professor Dr.W.Broser bin ich für die Uebernahme dieser Arbeit sowie seine stete Diskussionsbereitschaft sehr zu Dank verpflichtet.

Besonders herzlich möchte ich Herrn Professor Dr.G.Manecke für die großzügige Unterstützung danken, durch die er mir die Fortführung der Arbeit an diesem Institut ermöglichte.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	4
II.	Problemstellung.	6
III.	Synthese	9
IV.	Reinigung.	17
V.	Konstitution und Eigenschaften	21
VI.	IR-Absorptionsspektren	25
VII.	Rotationsdispersion	
	1. Allgemeines	29
	2. Rotationsdispersion von Cyclopeptiden . .	32
	a) Rotationsdispersion des Cyclododeka-	
	peptids und des entsprechenden Cyclo-	
	hexapeptids.	34
	b) Drude-Gleichung.	37
	c) Uebersicht über die Rotationsdisper-	
	sion einiger anderer Cyclopeptide. . .	38
	d) Vergleich des Cyclododekapeptids mit	
	den übrigen Cyclopeptiden	44
	3. Zeitabhängigkeit der spezifischen Drehung	45
VIII.	Diskussion der Ergebnisse	
	1. Zur optischen Inaktivität 1,4-sequenter	
	symmetrischer Cyclopeptide.	47
	2. Konformationsprobleme	48
	a) Einfluß der Ringgröße.	48
	b) Sequenz und Seitenketteneinflüsse. . .	48
	c) Konformationsmodelle	49
	d) Konformationsunterschiede in	
	DMF und DCE	53
	e) Zeitabhängigkeit	54
IX.	Experimenteller Teil	
	1. Präparatives	56
	2. Meßwerte	64
	3. Meßbedingungen	65
X.	Zusammenfassung.	66
XI.	Literaturverzeichnis	70

I. E i n l e i t u n g

Cyclopeptide haben in den letzten Jahren großes Interesse gefunden, nachdem man festgestellt hatte, daß verschiedene, biologisch hoch aktive Peptide ringförmig aufgebaut sind. Gramicidin S (1), Tyrocidin A und B (2), die Polymyxine (3) und Bacitracin A (4) sind z.B. solche mit antibiotischer Wirkung. In ihnen sind die Aminosäuren ausschließlich durch Peptidbindungen miteinander verknüpft; man nennt sie homodeten (5). Auch gewisse Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen, z.B. Ferrichrom (6) und Ferrichrysin (7) gehören in diese Gruppe. Zur zweiten Gruppe, den heterodeten (5) Cyclopeptiden, die auch andere Bindungstypen (z.B. Ester- oder Disulfidbindungen) im Ring enthalten können, gehören z.B. Insulin (8), Ocytocin (9), Vasopressin (10) und einige Mutterkornalkaloide (11), die alle Hormonwirkung besitzen, sowie die beiden Antibiotica Valinomycin (12) und Actinomycin C₃ (13). Phalloin und Phalloidin (14), die Giftstoffe des grünen Knollenblätterpilzes, enthalten sowohl einen homodeten als auch einen heterodeten Peptidring. Möglicherweise sind auch einige Proteine, z.B. das Ovalbumin und gewisse Muskelproteine, ringförmig aufgebaut (15).

Die hohe biologische Aktivität und Spezifität dieser cyclischen Polypeptide liegt möglicherweise schon in der Primärstruktur begründet, wohingegen man bei linearen Peptiden als sicher annehmen kann, daß erst die Sekundär- oder Tertiärstruktur dafür ausschlaggebend ist. (Unter Primär-

I. E i n l e i t u n g

struktur versteht man die chem. Konstitution der Moleküle, unter Sekundärstruktur die Konformation des Einzelmoleküls, die u.a. von den Wasserstoffbrücken-Bindungen abhängig ist (z.B. α -Helix- und "pleated sheet"-Struktur der Polypeptide), während man die Packung der Einzelmoleküle als Tertiärstruktur bezeichnet.

Während über die Konformation der Proteine und Polypeptide und die durch sie bedingten Eigenschaften umfangreiches Untersuchungsmaterial vorliegt (16), sind solche Probleme an Cyclopeptiden wenig untersucht. Vielmehr standen bisher Isolierung, Konstitutionsaufklärung und Synthese der natürlich vorkommenden im Vordergrund des Interesses. Außerdem wurde auch in den letzten zehn Jahren eine große Anzahl in der Natur nicht gefundener, einfacher gebauter Cyclopeptide (Cyclotri- bis Cyclooctapeptide, vor allem Cyclohexapeptide) synthetisiert (5,17-62). Nur in wenigen Fällen wurde die Sekundär- bzw. Tertiärstruktur geklärt (Gramicidin S (63-65)) bzw. am Modell diskutiert (49,61).

W.Lautsch (38,50,66,67) hat die Bearbeitung des Konformationsproblems in Angriff genommen, nachdem er ebenfalls mit der Synthese heterodeter (68-75) und homodeter (39,40,41,47, 52,59,60) Cyclopeptide begonnen hatte. Da sich die Messung der Rotationsdispersionen von Proteinen und linearen Polypeptiden zu deren Strukturaufklärung als sehr brauchbar erwiesen hatte (76-78), versuchte W.Lautsch, diese Untersuchungsmethode auch auf die Cyclopeptide anzuwenden und mit ihrer Hilfe Aussagen über die möglichen Strukturen bzw. Konformationen zu machen.

II. Problemstellung

R.Shingte (39) und H.Rauhut (40) machten die Beobachtung, daß die von ihnen synthetisierten Cyclopeptide $c\text{-(gly-L-phe-gly)}_2$ bzw. $c\text{-(gly-L-tyr-gly)}_2$ mit spez. Drehungen von -81° bzw. $-66,8^\circ$ (in Dimethylformamid, DMF) in dichloressigsaurer Lösung im Bereich von 500-700 nm keine optische Drehung zeigten. (Die Möglichkeit einer Racemisierung konnte ausgeschlossen werden, da beide Peptide nach Rückgewinnung aus Dichloressigsäure (DCE) wieder die ursprüngliche Drehung in DMF besaßen). Sie sind beide nach dem folgenden Bauprinzip aufgebaut (1,4-sequent in bezug auf die L-Aminosäure):



● : Optisch aktive (L-)Aminosäure
(mit aromatischer Seitenkette),

o : Glycin

Um festzustellen, ob es sich hier um eine allgemeine Eigenschaft 1,4-sequenter Hexapeptide handelte, und, wenn ja, worauf sie beruhen könnte, synthetisierten W.Lautsch und Mitarb. eine Anzahl von Cyclohexa- und -octapeptiden (40, 41, 52, 59, 60), in denen sie systematisch die Sequenzen (und damit auch das Bauprinzip) änderten und die optisch aktiven Aminosäuren variierten.

Drei dieser Cyclopeptide waren nach dem oben erwähnten Bauprinzip gebaut, zwei davon, das $c\text{-(gly-L-glu-gly)}_2$ und das $c\text{-(gly-γ-Me-L-glu-gly)}_2$ (41) drehten in DCE ebenfalls nicht, das dritte, $c\text{-(gly-p-Nitro-L-phe-gly)}_2$ zeigte eine normale Rotationsdispersion. Alle übrigen besaßen ein- wenn z.T. auch geringes - optisches Drehvermögen, was besonders bei

II. P r o b l e m s t e l l u n g

Wellenlängen unter 500 nm deutlich wurde.

Weiterhin mußte untersucht werden, ob die beobachtete optische Inaktivität

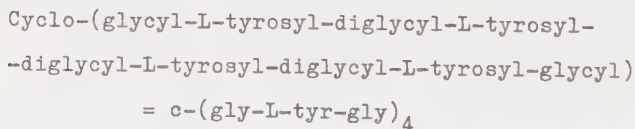
1. von der Sequenz,

2. von der Ringgliederzahl oder

3. von der Natur der Seitenketten

abhängig ist.

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, einen Beitrag zur Klärung dieser Fragen zu liefern. Zu diesem Zweck sollte erstmals ein homodetes, cyclisches D o d e k a p e p t i d , das



synthetisiert werden, das dieselbe optisch aktive Aminosäure enthält und mit derselben Sequenz aufgebaut ist, wie eines der durch optische Inaktivität in DCE ausgezeichneten Cyclohexapeptide, nämlich $\text{c-(gly-L-tyr-gly)}_2$ (40).

Die Rotationsdispersion des Cyclododekapeptids in DCE und DMF war im Bereich von 300-600 nm zu messen und mit der des Cyclohexapeptids zu vergleichen. Da die Rotationsdispersion des letzteren bisher nur im Bereich von 500-700 nm bestimmt wurde, mußte sie für den gewünschten Bereich noch aufgenommen werden.

Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob mit Hilfe der

II. P r o b l e m s t e l l u n g

Rotationsdispersionsmessungen und event. der IR-Absorptionsspektren Aussagen über die Konformation der cyclischen Peptide gemacht werden können. Dazu war es nötig, Arbeiten aus dem gleichen Mitarbeiterkreis, die sich mit der Rotationsdispersion von Cyclopeptiden befassen, in dieser Richtung auszuwerten und die Ergebnisse einer vergleichenden Betrachtung zu unterziehen.

III. S y n t h e s e

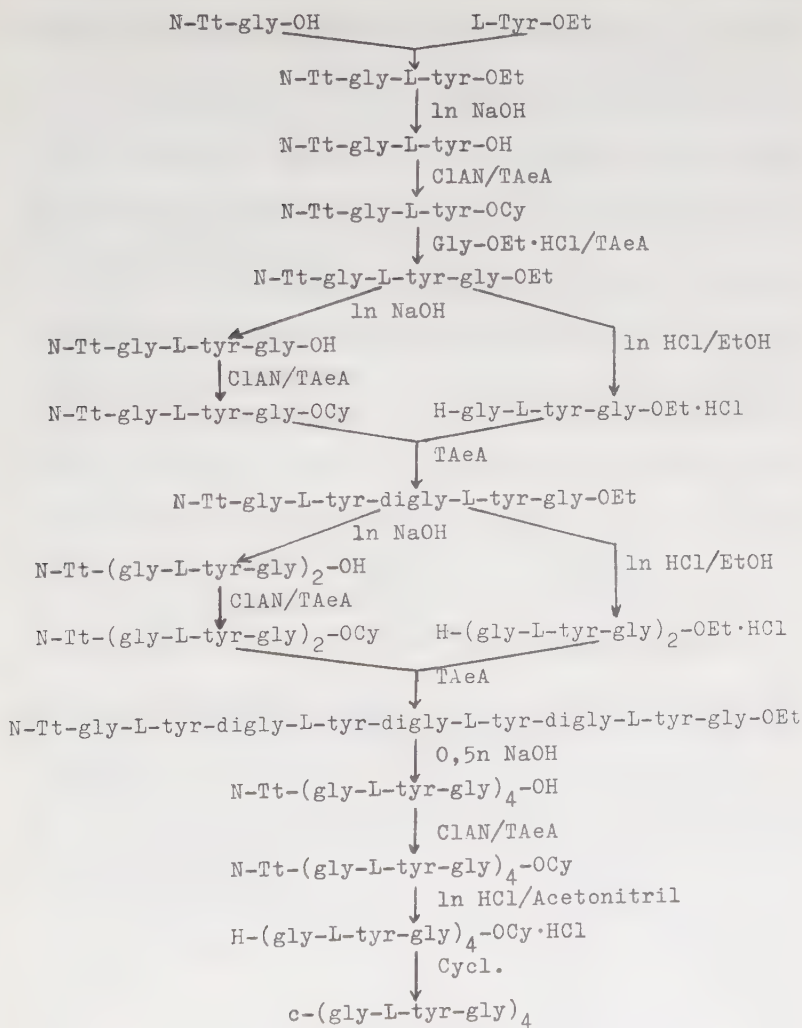
Die Darstellung des Cyclo-(gly-L-tyr-gly)₄ erfolgte nach dem Schema I (s.S.10).

Als N-terminale Schutzgruppe diente durchweg der Triphenylmethylrest (= Trityl-) (79,80), die Carboxylgruppe wurde durch Esterbildung (Aethylester) geschützt.

Der Trityldipeptidester wurde nach der Methode des gemischten Anhydrids von R.A.Boissonnas (81) in 65-70%iger Ausbeute erhalten. Die Darstellung des Tripeptidesters und des Tritylhexapeptidesters erfolgte nach dem Verfahren von R.Schwyzler (82) durch Kupplung der Tritylpeptidcyanmethylester mit der freien Aminogruppe des Aminosäureesters bzw. Peptidesters. Die Ausbeuten betrugen 80% im Falle des Tripeptids, 70% beim Hexapeptid. Die Vorstufen bis zum Tritylhexapeptidcyanmethylester waren bekannt (40) und wurden im wesentlichen nach den dort gegebenen Vorschriften hergestellt. Die freien Säuren des Tritylpeptids und des Tritylhexapeptids sind nur als Öl beschrieben, konnten hier jedoch kristallin und analysenrein erhalten werden.

Die weiteren Reaktionsschritte vom Hexapeptid zum Trityldodekapeptidcyanmethylester erfolgten nach der gleichen Methode: Kupplung des Tritylhexapeptidcyanmethylesters mit enttrityliertem Hexapeptidäthylesterhydrochlorid, Verseifung des Trityldodekapeptidesters und Cyanmethylierung der freien Säure. Anschliessend wurde die N-Schutzgruppe abge-

III. Synthese



Schema 1: Synthese des Cyclododekapeptids ⁺⁾

⁺⁾ Abkürzungen siehe Fußnote S.56

III. S y n t h e s e

spalten und das dabei erhaltene Dodekaeptidcyanmethylesterhydrochlorid cyclisiert. Jedoch zeigte sich, daß die Umsetzung des Hexapeptids zum Dodekaeptid und die weiteren Reaktionen bei weitem nicht mehr so glatt verliefen wie bei den kürzerkettigen Peptiden. Die Ausbeuten verschlechterten sich merklich, sobald die Ansätze größer als etwa $0,3 \cdot 10^{-3}$ molar waren. Beträchtliche Schwierigkeiten ergaben sich insbesondere bei der Aufarbeitung und Reinigung der verschiedenen Derivate des Dodekaeptids. Infolge ihrer hohen Molekulargewichte ($\sim 1200-1430$) sind sie in den meisten der üblichen Lösungsmittel (Methanol, Aethanol, Essigester, Tetrahydrofuran) nur noch sehr schlecht löslich und zeigen keine Neigung zur Kristallisation, vielmehr bildeten sich in diesen Lösungsmitteln, zumal in Gegenwart von Wasser, fast ausschließlich Gallerten.

Ebenso wie es von Polypeptiden bekannt ist (83), hielten die hier beschriebenen Dodekaeptidderivate einmal aufgenommenes Wasser hartnäckig fest. Selbst nach mehrtägigem Trocknen bei $60-100^\circ$ im Vacuum enthielten sie alle noch ein Mol Wasser, das erst bei (oder über) 110° im Vacuum entzogen werden konnte; schon bei kurzem Stehen an der Luft nahmen sie es wieder auf.

N-Trityl-(gly-L-tyr-gly)₄-äthylester

Die Reaktion des N-Tritylhexapeptidcyanmethylesters mit dem Hexapeptidäthylester-hydrochlorid in absolutem Dimethylformamid verlief - bei kleinen Ansätzen (s.oben) - mit guter

III. S y n t h e s e

Rohausbeute (80%). Das Reaktionsgemisch wurde in Essigester aufgenommen und wie üblich nacheinander mit wäßrigen Lösungen von Citronensäure, Natriumhydrogencarbonat und Natriumchlorid gewaschen. Das gelang jedoch nur, wenn man den Ansatz in mehreren, möglichst kleinen Portionen aufarbeitete, da der Dodekapeptidester in Essigester so schwer löslich war, daß er beim Zusetzen von Waschlösungen ziemlich bald, mitunter spontan, als Gallerte ausfiel. Es gelang jedoch, durch häufige Zugabe von etwas Aethanol beim Ausschütteln die Gallertbildung meist soweit zu verzögern, daß die Waschoperation zu Ende geführt werden konnte. Der Essigester wurde im Vacuum eingeengt. Einmal ausgefallene Gallerte ließ sich auch durch größere Mengen Essigester und Alkohol nicht mehr in Lösung bringen. Sie wurde abzentrifugiert und durch wiederholtes Verreiben mit den Waschlösungen bzw. dest. Wasser und Zentrifugieren gereinigt. Das gallertartige Rohprodukt konnte durch Verreiben mit Aether vom restlichen Lösungsmittel befreit und in eine amorphe Form übergeführt werden. Die weitere Reinigung erfolgte durch zweimaliges Umlösen aus Methanol, wobei die Lösung beim Abkühlen wieder zu einer Gallerte erstarrte, die sich durch Zentrifugieren wenigstens teilweise vom Lösungsmittel befreien ließ. Zum Schluß wurde in einem Ueberschuß von Methanol gelöst und in die noch heiße Lösung unter kräftigem Rühren Aether eingetropft. Dabei fiel der Peptidester in feinverteilter, gut zentrifugierbarer Form (jedoch nicht kristallin) an. Er wurde über P_2O_5 bei 60° (für die Analyse der wasserfreien

III. S y n t h e s e

Substanz bei 110°) i.V. getrocknet.

Die Ausbeute an reinem Produkt betrug etwa 55% .

N-Trityl-(gly-L-tyr-gly)₄-OH

Im Gegensatz zu den Verseifungsreaktionen des Di-, Tri- und Hexapeptidesters, bei denen (n + 1) Mol Natronlauge pro Mol Ester (n = Zahl der phenolischen OH-Gruppen bzw. der Tyrosinreste) nötig waren, genügten zur Verseifung des Dodekapeptidesters bereits 3 (statt 5) Mol Natronlauge. Die freie Säure wurde mit der äquivalenten Menge an 0,1 n Salzsäure ausgefällt. Die etwas gallertartigen Flocken lösten sich nicht in Essigester, eine Aufarbeitung in der üblichen Weise war daher nicht möglich. Das Produkt wurde abzentrifugiert und wiederholt mit destilliertem Wasser digeriert, bis keine Chloridionen mehr nachweisbar waren. Anschließend wurde es zweimal aus Aethanol umgelöst. Ließ man die äthanolische Lösung unter kräftigem Rühren langsam erkalten, konnte man die Dodekapeptidsäure in fester, kaum noch gallertartiger Form erhalten, anderenfalls bildete sie ein Gel. Sie wurde wie oben getrocknet, die Ausbeute betrug reichlich 70%.

N-Trityl-(gly-L-tyr-gly)₄-cyanmethylester

Die Cyanmethylierung verlief mit guter Rohausbeute (75%), sofern etwas absolutes Dioxan als Lösungsvermittler zugegeben wurde, was sich bereits bei der Cyanmethylierung des Di- und Tripeptids als vorteilhaft erwiesen hatte. Bei der

III. S y n t h e s e

Aufarbeitung ergaben sich dieselben Schwierigkeiten wie beim Trityldodekaeptidäthylester. Es wurde analog verfahren. Da sich der Cyanmethylester nur sehr langsam in Athanol löste, andererseits bei zu langem Erhitzen eine Umes-terung zu befürchten war, wurde das Rohprodukt in Anteilen von höchstens 50 mg einmal aus Aethanol umgelöst; schon bei geringer Abkühlung bildete sich wieder eine Gallerte, welche sich durch Verreiben mit Aether in festes Produkt überführen ließ. Es konnte aus einem Acetonitril-Aethanol-Gemisch (2:1) in 60%iger Ausbeute rein erhalten werden.

H-(Gly-L-tyr-gly)₄-cyanmethylester-hydrochlorid

Die Enttritylierung gelang mit beinahe 90%iger Ausbeute nach der von R.Schwyzler (84) für Tritylhexapeptidcyanmethylester angegebenen Methode mit Chlorwasserstoff in Acetonitril in der Siedehitze, unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit. Da sich die Substanz im Laufe der Reaktion nicht löste, sondern sich leicht in harziger Form am Boden festsetzte, mußte kräftig gerührt werden. Der abgespaltene Tritylrest konnte zum größten Teil durch mehrmaliges Verreiben mit absol. Aether herausgelöst werden. Zur weiteren Reinigung wurde das Rohprodukt aus einer Lösung in Acetonitril/Aethanol (2:1) mit absol. Aether ausgefällt. Beim Trocknen über P₂O₅ und KOH bei 110° im Vacuum behielt die Substanz 1 Mol Wasser, auch hartnäckig anhaftende Salzsäure konnte bei dieser Temperatur nicht restlos entfernt werden. Sie ist hygroskopisch.

III. S y n t h e s e

Cyclo-(gly-L-tyr-gly)₄-

Cyclisierung:

Der Ringschluß kann nach demselben Prinzip wie die Kuppelung zu linearen Peptiden erfolgen, nämlich durch Reaktion einer aktivierten Estergruppe mit einer freien Aminogruppe. Es entstehen also nebeneinander das Cyclopeptid und lineare Polypeptide. Um die Bildung der letzteren zugunsten des ersteren hintan zu halten, muß in stark verdünnter Lösung gearbeitet werden. Diese allgemein anwendbare Cyclisierungsmethode geht auf R.Schwyzler zurück (5).

Zur Darstellung des Cyclo-(gly-L-tyr-gly)₄ wurde H-Dodekapeptidcyanmethylester-hydrochlorid eingesetzt. Da bereits die Synthese dieser linearen Vorstufe ziemlich mühsam war, wurden, um für die Cyclisierung hinsichtlich Ausbeute und Reinheit des Endproduktes möglichst günstige Bedingungen zu finden, zwei verschiedene Methoden angewandt und miteinander verglichen, und zwar wurde in einem Fall

a) genau nach den Angaben von R.Schwyzler (5), im anderen Fall b) nach einem vereinfachten Verfahren gearbeitet:

- a) Der in absolutem Dimethylformamid gelöste Dodekapeptidcyanmethylester ($0,25 \cdot 10^{-3}$ Mol) wurde sehr langsam (im Verlauf von 6-8 Stunden), in etwa 100 ml heißes absol. Pyridin eingetropft, dem einige Tropfen Eisessig zugesetzt worden waren. Danach wurde die Lösung entweder noch 2 Stunden auf 95° gehalten oder über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen.

III. S y n t h e s e

- b) Der feinpulverisierte Cyanmethylester ($0,25 \cdot 10^{-3}$ Mol) wurde auf einmal unter Rühren in 600 ml heißes absol. Pyridin (ohne Eisessigzusatz) eingetragen und ebenfalls 6 - 8 Stunden erhitzt (95°). Der Cyanmethylester löste sich im Verlauf von etwa zwei Stunden auf. Der Ansatz blieb über Nacht stehen.

Isolierung:

Die Aufarbeitung erfolgte bei beiden Ansätzen in derselben Weise: Abdestillieren des Pyridins im Vacuum bei etwa 40° , zweimalige Zugabe von Aethanol/ H_2O (2:1) zum Rückstand, Abdestillieren des Lösungsmittels, Umlösen des halbfesten braunen Rückstandes aus etwa 60%igem Methanol unter Zusatz von Aktivkohle. Beim Abkühlen fiel die Substanz anfangs in weißlichen Flocken, die Hauptmenge aber ölig aus. Durch wiederholtes Verreiben mit Wasser verfestigte sich das Oel so weit, daß es abgesaugt werden konnte. Die Rohausbeute betrug im ersten Fall (a) knapp 30%, im zweiten Fall (b) etwas über 40%, allerdings war das Produkt aus b etwas stärker verunreinigt.

Die Ausbeute an reinem Produkt betrug bei dem nach Methode a) dargestellten Produkt 2,9%, bei dem nach b) dargestellten 3,5%.

Das Verfahren b war also, obwohl die Substanz anfangs stärker verunreinigt war, um 20% ertragreicher als das Verfahren a; die Cyclisierung nach b war einfacher, die Isolierungs- und Reinigungsarbeit (s. nächstes Kapitel) war bei beiden gleich.

Damit stellte sich das Verfahren b als das vorteilhaftere heraus.

IV. R e i n i g u n g

Eine papierchromatographische Untersuchung der beiden Rohprodukte mit Methyläthylketon-Pyridin-Wasser (80:5:15) als Laufmittel ergab bei dem nach a) hergestellten eine Auftrennung in 4, bei dem nach b) hergestellten eine Auftrennung in 5 Komponenten. Die Chromatogramme wurden mit dem Reagens nach Pauly (88) auf phenolische OH-Gruppen und mit Ninhydrin entwickelt. Alle Reaktionsprodukte müssen Pauly-positiv sein; ninhydrin-positiv sind nur solche mit freier NH_2 -Gruppe, also lineare (Poly-)Peptide, das cyclische Produkt muß wegen der Abwesenheit primärer Aminogruppen also ninhydrin-negativ sein. Die R_F -Werte wurden durch Entwicklung mit Pauly's Reagens bestimmt.

a			b		
R_F -Werte	Pauly	Ninhydrin	R_F -Werte	Pauly	Ninhydrin
0	(stark)	+	0	(stark)	+
0,23	(schwach)	+	0,22	(schwach)	+
0,35	(schwach)	+	0,43	(schwach)	+
-			0,63	(ziemlich stark)	-
0,88	(stark)	-	0,86-0,89	(stark)	-

Da bei dem Produkt a nur die Komponente mit dem R_F -Wert 0,88 ninhydrin-negativ war, mußte es sich dabei um das gewünschte Cyclopeptid handeln. Das Produkt b enthielt außerdem eine Komponente mit dem R_F -Wert 0,63, die offenbar auch cyclisch gebaut war, da sie ebenfalls keine Ninhydrinreaktion zeigte.

Cyclische Hexa- und Octapeptide lassen sich aus den Rohprodukten durch einfache Umkristallisation (evtl. mit Aktivkohle) leicht in reiner Form gewinnen (59). Als Lösungs-

IV. R e i n i g u n g

mittel kommen hauptsächlich Eisessig, Wasser, Methanol oder Aethanol in Frage.

Entsprechende Versuche zur Reinigung des cyclischen Dodekapeptids schlugen jedoch fehl: es konnte weder von den Verunreinigungen befreit werden - nur die Komponente mit dem R_F -Wert 0 (lineares Polypeptid) wurde teilweise abgetrennt - noch ließ es sich zur Kristallisation bringen.

Die chromatographische Trennung an Säulen mit saurem bzw. basischem Aluminiumoxyd erwies sich nach einer Reihe von Versuchen als die erfolgreichste, wenn auch verlustreiche Reinigungsmethode.

Zuerst wurde über eine Säule mit saurem Aluminiumoxyd chromatographiert. Die Substanz wurde in wäßrig-methanolischer Lösung aufgetragen und nacheinander mit absol. Methanol, 80%igem Methanol, 50%igem Methanol, destilliertem Wasser und 50%iger Essigsäure eluiert. Die Hauptmenge an cyclischem Produkt fand sich in den wäßrig-methanolischen Eluatén. Der größte Teil des linearen Polymeren wurde zwar erst mit Essigsäure ausgewaschen, geringe Mengen fanden sich jedoch auch in den Methanolauszügen, wie die erneute papierchromatographische Prüfung zeigte (Laufmittel, Entwicklungsreagentien wie oben):

IV. R e i n i g u n g

a			b		
R _F	Pauly	Ninhydrin	R _F	Pauly	Ninhydrin
0	(schwach)	+	0	(schwach)	+
-			0,63	(ziemlich stark)	-
0,88	(stark)	-	0,88	(stark)	-

Die ninhydrin-negative Komponente mit dem R_F-Wert 0,63 im Produkt b konnte nicht abgetrennt werden. Dies gelang, ebenso wie die vollständige Abtrennung der Komponente mit dem R_F-Wert 0, erst auf einer Säule mit basischem Aluminiumoxyd. Dazu wurden die vereinigten Fraktionen von 80%igem und 50%igem Methanol stark eingengt, die Restlösung aufgetragen und in derselben Weise eluiert wie oben beschrieben. Das Cyclopeptid wurde ebenfalls mit wäßrigem Methanol ausgezogen. Die Lösung wurde im Vacuum bei 40° bis auf einige Milliliter eingengt, beim Abkühlen fiel die Substanz aus. Sie war immer noch schwach gelb bis gelbbraun gefärbt und nicht kristallin. Auf dem Papierchromatogramm mit Methyläthylketon-Pyridin-Wasser (80:5:15) als Laufmittel schien sie zwar einheitlich, weitere Prüfung durch Dünnschichtchromatographie mit Kieselgel G von Merck als Trägermaterial und n-Butanol-Eisessig-Pyridin-Wasser (15:2:10:12) als Laufmittel ergab aber eine nochmalige Auftrennung in zwei Komponenten; die Produkte a und b zeigten nun keinen Unterschied mehr:

R _F -Werte	Pauly	Ninhydrin
0,45	(sehr schwach)	+
0,71-0,73	(stark)	-

IV. R e i n i g u n g

Kristallisation:

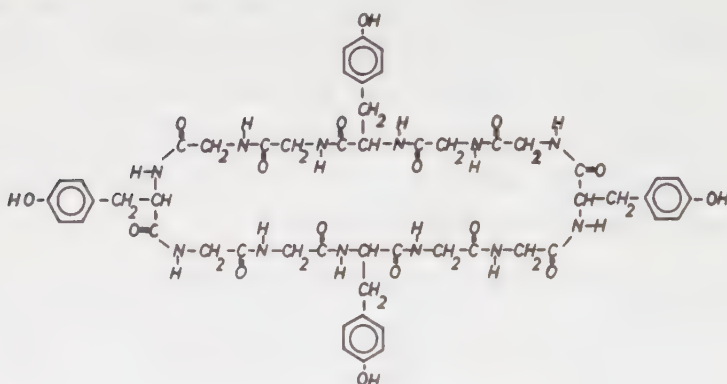
Die Substanz wurde nun in etwa 50%igem Methanol gelöst, die Lösung mehrere Tage bei 30° im Trockenschrank gehalten, um eine langsame, möglichst gleichmäßige Verdunstung des Methanols zu erreichen. Dadurch fiel das Cyclopeptid langsam aus, es war größtenteils fest (mit geringen gallertartigen Anteilen). Auf diese Weise wurde es noch zweimal behandelt, die ausgefallene Substanz aber in der Mutterlauge längere Zeit (manchmal bis zu vier Wochen) bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dabei verfestigte sich das Ausgefallene langsam und begann zu kristallisieren.

Zum Schluß wurde noch zweimal aus tridestilliertem Wasser umkristallisiert. Die wäßrige Lösung mußte extrem langsam abgekühlt werden, da das Cyclopeptid sonst zu schnell und nicht kristallin ausfiel. Es empfahl sich auch hierbei, die bis auf 30° abgekühlte Lösung längere Zeit bei dieser Temperatur stehen zu lassen. Das Cyclopeptid fiel wieder erst halbfest aus, bevor - äußerst langsam - die Kristallisation erfolgte.

V. Konstitution und Eigenschaften

Konstitution:

Das in der beschriebenen Weise dargestellte und gereinigte Produkt hat folgende Konstitution:



Sie ist sichergestellt durch folgende Befunde:

1) Die Molekulargewichtsbestimmung nach R.Schwyzer (5) ergab einen durchschnittlichen Wert von 1168, das berechnete Molekulargewicht liegt bei 1127. Daraus folgt, daß es sich um das Peptid mit 12 Aminosäureeinheiten handeln muß, da nach dem Gang der Synthese außer dem Dodekapeptid nur Polypeptide mit $n \cdot 12$ Aminosäureeinheiten in Frage kommen.

(n = ganze Zahl > 1)

2) Die Verbindung ist ninhydrin-negativ, d.h. sie enthält keine freie Aminogruppe mehr. Da in der vorletzten Stufe die N-Schutzgruppe abgespalten worden war (s.S.14), müßte

V. K o n s t i t u t i o n u n d E i g e n s c h a f t e n

ein nicht cyclisiertes (lineares) Dodekapeptid ninhydrin-positiv sein.

3) Das IR-Spektrum (s.S.28) beweist ebenfalls die Abwesenheit von Endgruppen; die beiden für die Carboxylatgruppe bzw. NH_3^+ -Gruppe charakteristischen Banden bei 4μ bzw. $6,3\mu$ fehlen.

Eigenschaften

Das Cyclopeptid hat eine ausgeprägte Neigung, Fremdmoleküle festzuhalten.

Das erklärt sich einmal aus den zahlreichen Möglichkeiten zur Bildung von H-Brücken-Assoziaten und Komplexen, die sich aus der Anwesenheit von 12 NH-CO-Gruppen und 4 phenolischen OH-Gruppen im Molekül ergeben. Zum anderen erklärt es sich aus der Größe des Ringes und der daraus resultierenden Fähigkeit zur Bildung von Einschlußverbindungen. Ein Hinweis darauf ergibt sich aus der unter dem Mikroskop gemachten Beobachtung, daß das scharf getrocknete, amorphe Produkt bei Zugabe eines Tropfens Toluol (in dem es sich nicht löst) innerhalb von 20 bis 30 Minuten in wohlausgebildeten sehr feinen Nadelchen kristallisierte. Die Nadeln sind doppelbrechend mit paralleler Auslöschung.

Im Gegensatz zu den Cyclohexapeptiden kristallisiert das Cyclododekapeptid nur sehr schwer aus seinen Lösungen. Seine geringe Kristallisationsfähigkeit könnte ihren Grund darin haben, daß es eine energetisch ungünstige Konfor-

V. K o n s t i t u t i o n u n d E i g e n s c h a f t e n

mation hat (s.S.52),

Obwohl die Kristallisation äußerst langsam verläuft, sind die entstehenden Nadeln mikroskopisch klein. Die Aufnahme eines Pulverdiagramms (s.S.65) des aus Wasser erhältlichlichen Produkts ergab Reflexe bei $2\theta = 6,9^\circ, 23,4^\circ, 39,0^\circ$ und $66,7^\circ$.

Die Substanz ist hygroskopisch und schließt Kristallwasser ein; nach dem Trocknen bei 60° i.V. enthält sie noch ein Mol Wasser, durch Trocknen bei 150° i.V. konnte sie wasserfrei erhalten werden.

Sie löst sich in Wasser und Eisessig ziemlich gut, in wäßrigem Methanol, Aethanol und Tetrahydrofuran sehr gut, in den entsprechenden absoluten Lösungsmitteln dagegen kaum.

Das $c\text{-(gly-L-tyr-gly)}_4$ zeigt bei 589 nm und einer Temperatur von 20°C eine spezifische Drehung von -20° , bei 25°C beträgt die spezifische Drehung -26° .

Der Schmelzpunkt der kristallwasserhaltigen Substanz liegt bei 264° , derjenige der scharf getrockneten Substanz bei 245° . Verschiedene R_F -Werte der reinen Substanz sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

V. K o n s t i t u t i o n u n d E i g e n s c h a f t e n

Träger	Laufmittel	R _F -Wert
Papier	Methyläthylketon- Pyridin - Wasser 80 : 5 : 15	0,88
	Tridestilliertes Wasser	0,55
Kiesel- gel G	Methyläthylketon- Pyridin - Wasser 80 : 5 : 15	0,40
	n-Butanol-Eisessig-Pyridin-Wasser 15 : 2 : 10 : 12	0,72

VI. IR - A b s o r p t i o n s s p e k t r e n

In Abb. 1 ist das IR-Spektrum des Cyclododekapeptids (I) wiedergegeben, sowie, zum Vergleich, das des analogen Cyclohexapeptids $c\text{-(gly-L-tyr-gly)}_2$ (II) ⁺⁾ . Die Aufnahmen wurden mit KBr-Preßlingen gemacht.

Die beiden Peptide stimmen in den charakteristischen Banden bis auf minimale Verschiebungen überein. Gewisse Unterschiede, für die eine Deutung noch aussteht, zeigen sich bei einigen schwachen Banden zwischen 7 und 12 μ .

Die wichtigsten Banden und ihre Zuordnung (123)

3,0/3,08 μ (2,95 μ) ⁺⁺⁾: Diese Bande wird verursacht durch die NH-Valenzschwingung sekundärer Amide und die OH-Valenzschwingung assoziierter Hydroxylgruppen. Die Lage der Bande spricht für das Vorliegen von Wasserstoffbrücken, im Falle nicht assoziierter NH- und OH-Gruppen müßte sie im Bereich kürzerer Wellen liegen.

6,1 μ : Die sog. "Amidbande I" rührt von der CO-Valenzschwingung in Säureamiden her. Ihre Lage ist in charakteristischer Weise von der Art der am Stickstoff erfolgten Substitution abhängig: Bei monosubstituierten Amiden, wie sie in der Peptidbindung vorliegen (-CO-NH-) müßte sie bei 5,96 μ liegen,

⁺⁾ Das IR-Spektrum von II wurde der Dissertation von H. Rauhut (40) entnommen.

⁺⁺⁾ Die Zahlen in Klammer beziehen sich auf II.

VI. IR - A b s o r p t i o n s s p e k t r e n

ist jedoch in festen Stoffen immer in Richtung längerer Wellen verschoben. Das erklärt sich so, daß die Peptidbindung zu einem beachtlichen Prozentsatz Doppelbindungscharakter besitzt ($-\overset{\textcircled{O}}{\underset{\textcircled{O}}{\text{C}}}=\text{NH}-$) (124) und die Carbonylschwingung dadurch eine kleinere Frequenz hat. Darüber hinaus ist diese Bande typisch für die Konformation von Polypeptiden (92), für α -Helices liegt sie bei $6,05\mu$, für pleated sheet-Strukturen bei $6,13\mu$. Für Cyclopeptide liegt sie im allgemeinen zwischen diesen Werten.

$6,55/6,63\mu$ ($6,5/6,62\mu$): Die Herkunft der sog. "Amidbande II" ist nicht endgültig geklärt, wahrscheinlich ist sie einer NH-Valenzschwingung zuzuordnen. Diese Bande erlaubt bei Polypeptiden ebenfalls Rückschlüsse auf die Konformation; α -Helices und pleated-sheet-Strukturen sind deutlich unterschieden. Für Cyclopeptide läßt sich jedoch keine charakteristische Lage angeben.

In anderer Hinsicht aber ist diese Bande wichtig. Sie ist nämlich ein sicheres Indiz für das Vorliegen trans-verknüpfter Peptidbindungen (121,61): Sind die Peptidbindungen cis-verknüpft, so fehlt die Bande.

$8,12\mu$ ($8,13\mu$): Eine sichere Zuordnung für diese relativ starke Bande kann nicht gegeben werden; sie findet sich fast immer in den IR-Spektren von Cyclopeptiden, ebenso wie die Bande bei $7,5\mu$.

Die schwachen Banden zwischen $6,9$ und $7,5\mu$ sind auf

VI. IR - A b s o r p t i o n s s p e k t r e n

CH-Deformationsschwingungen zurückzuführen.

Im Spektrum des Cyclododeka- wie auch des Cyclohexapeptids fehlen erwartungsgemäß die Bande der ionisierten Carboxylgruppe (starke Bande zwischen 6,2 und 6,4 μ) sowie die der Ammoniumgruppe $-\text{NH}_3^+$ (breite, verwaschene Bande bei etwa 4 μ). Dieser Umstand kann als ein Beweis dafür dienen, daß die Peptide tatsächlich cyclisch gebaut sind. Lineare Polypeptide müßten infolge ihrer zwitterionischen Natur diese beiden Banden erhalten.

VI. IR - Absorptionsspektren

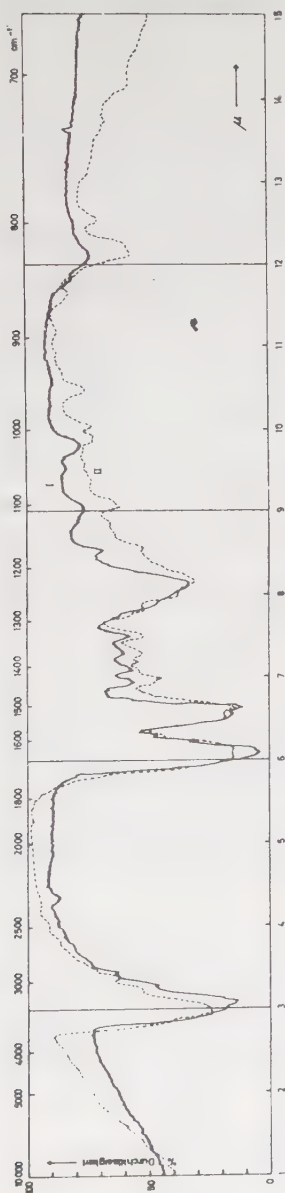


Abb.1 IR-Absorptionsspektren von $c\text{-(gly-L-tyr-gly)}_4$ (I)
und $c\text{-(gly-L-tyr-gly)}_2$ (II)

VII. Rotationsdispersion

1. Allgemeines:

Die Untersuchung der Rotationsdispersion (=Änderung der spezifischen Drehung mit der Wellenlänge) ist ganz allgemein ein sehr geeignetes Mittel, um Aufschlüsse über die Konfiguration optisch aktiver Verbindungen zu erhalten, da ein enger Zusammenhang zwischen optischem Verhalten und Struktur besteht (87). Insbesondere in der Peptidchemie hat sich diese Methode als außerordentlich nützlich erwiesen. Nachdem mit Hilfe von Röntgenstrukturanalysen (88-93) bewiesen worden war, daß lineare Polypeptide bevorzugt in Form der α -Helix, daneben aber auch in einer gestreckten, der β -Form (auch "pleated sheet" genannt) (94,95) oder ganz ungeordnet in einer sog. "zufallsgeknäuelten" Form vorliegen können, fand man, daß die verschiedenen Konformationen ganz charakteristische Rotationsdispersionen besitzen. Durch deren Messung kann man also wesentlich einfacher als z.B. durch Röntgenanalysen die Konformation unbekannter Polypeptide oder Proteine ermitteln.

Eine Möglichkeit, die Rotationsdispersion quantitativ zu beschreiben, bietet eine von P. Drude (96) aus der Theorie der gekoppelten Oszillatoren abgeleitete Gleichung:

$$[\alpha]_{\lambda} = \sum_i \frac{A_i}{\lambda^2 - \lambda_i^2}$$

VII. Rotationsdispersion

Zur Beschreibung der "normalen" Rotationsdispersion (= Rotationsdispersion in Wellenlängenbereichen außerhalb des Absorptionsgebietes) genügt in den meisten Fällen die vereinfachte, eingliedrige Beziehung (97):

$$[\alpha]_{\lambda} = \frac{A}{\lambda^2 - \lambda_c^2}$$

wobei λ_c die Wellenlänge ist, bei der die zugehörige (d.h. die die optische Aktivität verursachende) Absorptionsbande ihr Maximum hat (98). λ_c erhält man aus der Steigung der Geraden, die sich - sofern die Drude-Gleichung erfüllt wird - bei Auftragung von $[\alpha]\lambda^2$ gegen $[\alpha]$ (99) ergibt. Eine Rotationsdispersion wird einfach genannt, wenn sie sich durch die eingliedrige Drude-Gleichung darstellen läßt. Ist dagegen eine mehrgliedrige Gleichung zur Beschreibung nötig, spricht man von "komplexer" Rotationsdispersion.

Die Anwendung dieser Gleichung auf lineare Polypeptide zeigte jedoch, daß nur die Rotationsdispersion der zufallsgeknäuelten Formen einfach ist, die der α -Helix und der β -Form aber komplex (100). Speziell für die Rotationsdispersion der α -Helix wurde von W. Moffitt und J.T. Yang (101-105) eine empirische Gleichung mit drei Konstanten a_0 , b_0 , λ_0 :

$$[R]_{\lambda} = \frac{a_0 \lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} \pm \frac{b_0 \lambda_0^4}{(\lambda^2 - \lambda_0^2)^2}$$

entwickelt. ($R = \frac{\alpha \cdot M}{100 \cdot n}$; M = Molekulargewicht, n = Anzahl der Aminoacylreste)

VII. Rotationsdispersion

Der für die Konformationsbestimmungen wichtige Parameter ist b_0 :

Für rechtsgewendelte α -Helices findet sich dafür in der Regel ein Wert von -630 (Ausnahmen siehe unten) bei einem λ_0 von 212 nm. Für die - bisher wenig untersuchten - β -Formen läßt sich keine solche Regel finden, sie haben unterschiedliche b_0 -Werte (meist kleiner als 630) bei ebenfalls verschiedenen λ_0 -Werten.

Die Rotationsdispersion der ungeordneten Strukturen gehorcht wie bereits oben erwähnt, der eingliedrigen Drude-Gleichung. Wendet man auf sie die Moffitt-Gleichung an, so erhält man für b_0 stets Null.

Der b_0 -Wert kann also zur Unterscheidung der einzelnen Konformationen dienen (77,100,106,107). Allerdings versagt diese Methode selbst bei manchen helicalen Polypeptiden, vornehmlich bei solchen mit aromatischen Seitenketten z.B. bei Poly-L-tyrosin (108-110) und bei Poly- β -benzyl-L-asparaginsäure (111): Die b_0 -Werte schwanken so stark, daß Vergleiche mit anderen Polypeptiden nicht mehr möglich sind. Man nimmt an, daß die Absorption des aromatischen Systems im nahen UV das Rotationsverhalten so stark beeinflusst (112).

Die Untersuchungen der Rotationsdispersion verschiedener Polypeptide unter verschiedenen Bedingungen zeigten folgendes: Das Vorliegen der einen oder anderen Konformation

VII. R o t a t i o n s d i s p e r s i o n

in Lösung hängt unter anderem ab

1. von der Natur des Lösungsmittels
2. von der Länge der Peptidkette.

Zu 1): Lösungsmittel, die wenig polar sind bzw. keine Protonen-Donator-Eigenschaften haben (z.B. Dimethylformamid, Chloroform) sind nicht in der Lage, intra- oder intermolekulare Wasserstoffbrücken zu lösen, in ihnen bleibt also die geordnete Struktur (Helix oder β -Form, je nach dem, welche in festem Zustand existiert) erhalten. Stark polare Lösungsmittel dagegen, z.B. Ameisensäure oder Dichloressigsäure, bewirken eine Lösung der intra- oder intermolekularen H-Brücken, an ihrer Stelle bilden sich solche zwischen den Peptidgruppen und den Lösungsmittelmolekülen aus. Dadurch geht die Sekundärstruktur verloren, d.h. es entstehen zufallsgeknäuelte Formen.

Zu 2): Kurzkettige Polypeptide liegen in der β -Form vor. Die Bildung einer Helix wird überhaupt erst möglich bei Ketten von mindestens 9 Aminosäureresten, bei mehr als 30 Resten ist die Helix stabil; dazwischen sind beide Konformationen möglich, die β -Form aber begünstigt (113-116).

2. Rotationsdispersion von Cyclopeptiden

Ueber Cyclopeptide liegt bezüglich der Rotationsdispersion nur wenig Untersuchungsmaterial vor.

Die Rotationsdispersion verschiedener Cyclopeptide in verschiedenen Lösungsmitteln (vor allem in Dimethylformamid und Dichloressigsäure) wurden qualitativ beschrieben (39,

VII. Rotationsdispersion

40,41,52,59). In einigen Fällen wurde die Drude- (41,52,60) oder Moffitt-Gleichung (60) auf sie angewendet. Da die Drude-Gleichung - wie oben erwähnt - ganz allgemein zur Beschreibung der "normalen" Rotationsdispersion dient, konnte man annehmen, daß ihre Anwendung auf Cyclopeptide Kriterien liefert, die einen Vergleich der Cyclopeptide untereinander gestatten.

Es ist jedoch höchst unwahrscheinlich, daß die Moffitt-Gleichung bei Cyclopeptiden zu brauchbaren Ergebnissen führt, da ihre Gültigkeit auf helicale Strukturen beschränkt ist (s. oben). Außerdem handelt es sich bei den hier untersuchten und zum Vergleich herangezogenen Cyclopeptiden fast ausnahmslos um solche mit aromatischen Seitenketten, so daß eine Anwendbarkeit der Moffitt-Gleichung auch aus diesem Grunde nicht zu erwarten ist.

Im folgenden wird die Rotationsdispersion des im Rahmen der vorliegenden Arbeit synthetisierten cyclischen Dodekapeptids $c\text{-(gly-L-tyr-gly)}_4$ (I) in Dimethylformamid (DMF) und Dichlor-essigsäure (DCE) beschrieben und der Rotationsdispersion des mit der gleichen Sequenz aufgebauten Cyclohexapeptids $c\text{-(gly-L-tyr-gly)}_2$ (II) (40) gegenübergestellt. Anhand dieser Gegenüberstellung wird noch einmal das Problem der optischen Inaktivität 1,4-sequenter Cyclopeptide in DCE diskutiert.

Darüber hinaus werden die von anderen Mitarbeitern des hiesigen Instituts beschriebenen Rotationsdispersionen einiger Cyclohexa- und -octapeptide (39-41,52,59,60) zum Vergleich

VII. Rotationsdispersion

mit denjenigen der hier näher untersuchten Peptide I und II herangezogen, um so zu allgemeineren Aussagen zu gelangen.

Insbesondere soll geprüft werden

- a) ob sich aus dem bis jetzt vorhandenen Material Hinweise auf einen spezifischen Einfluß der Ringgröße sowie der Sequenz und der Natur der Seitenketten auf die Rotationsdispersion ergeben,
- b) ob die - bereits früher beobachtete - unterschiedliche Rotationsdispersion der Cyclopeptide in DMF und DCE Rückschlüsse auf die Existenz verschiedener Konformationen erlaubt.

a) Rotationsdispersion des Cyclododekapeptids und des entsprechenden Cyclohexapeptids

Sämtliche Messungen erfolgten bei den Wellenlängen 313, 364, 436, 546, 578, 589 nm bei 20°C, die Konzentration der Meßlösungen betrug 0,5 g /100 ml.

Rotationsdispersion in DMF

In dem hier vermessenen Bereich, der außerhalb des Absorptionsgebietes liegt, zeigen I und II die erwartete normale Rotationsdispersion. Beide sind linksdrehend (negative Werte für $[\alpha]$). Die Drehwerte von I sind wesentlich kleiner und ihre Änderung mit der Wellenlänge ist wesentlich geringer als bei II (Abb.2).

VII. Rotationsdispersion

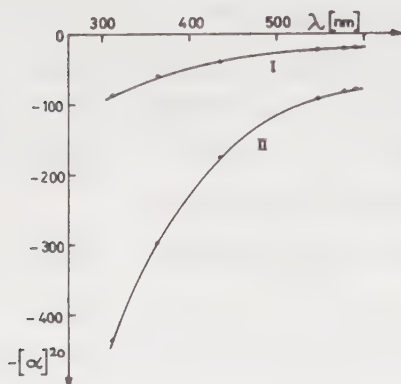


Abb. 2 Rotationsdispersion in DMF

Rotationsdispersion in DCE

I ist linksdrehend. Sein Drehvermögen in DCE ist relativ schwach, jedoch beträchtlich stärker als das -extrem geringe- des Cyclopeptides II.

Die Rotationsdispersion von I scheint, im Gegensatz zu II, ziemlich stark zu sein, soweit sich das bei nur 3 Meßwerten beurteilen läßt. (Infolge einer schwachen Gelbfärbung der Lösung konnte $[\alpha]$ nur bei 589, 578 und 546 nm gemessen werden) (Abb. 3).

VII. Rotationsdispersion

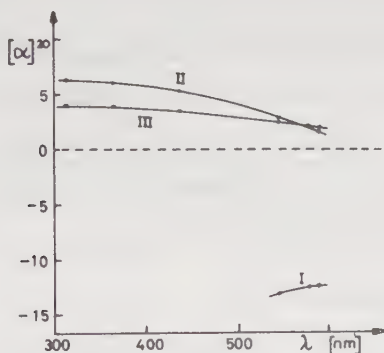


Abb. 3 Rotationsdispersion in DCE

Das Cyclopeptid II zeigt nach Angaben von H.Rauhut (40) zwischen 500 und 700 nm keine Drehung. Bei der hier durchgeführten Nachmessung ließ sich jedoch eine wenn auch geringe, so doch deutlich von 0 verschiedene positive Drehung feststellen: $[\alpha]_{589} = 1,8^\circ$, $[\alpha]_{578} = 2^\circ$, $[\alpha]_{546} = 3^\circ$.

In dem von H.Rauhut nicht mehr vermessenen kürzerwelligen Bereich ist die Drehung deutlich stärker: $[\alpha]_{313} = 6,5^\circ$. Die Rotationsdispersion ist schwach ausgeprägt.

Eine Ueberprüfung des c-(gly-L-phe-gly)₂ (III), das nach R.Shingte (39) in DCE im Bereich von 500 bis 700 nm ebenfalls optisch inaktiv sein soll, ergab ein ähnliches Resultat, allerdings besitzt III eine noch schwächer ausgeprägte Rotationsdispersion als II (Abb.3). Die Werte der spezi-

VII. Rotationsdispersion

fischen Drehung liegen hier zwischen 2° (589 nm) und 4° (313 nm).

Offensichtlich war das von R.Shingte und H.Rauhut benutzte Polarimeter mit einem zu großen Fehler behaftet, als das man damit so geringe Drehungen hätte messen können. Die Fehlerbreite des hier verwendeten Polarimeters (Perkin-Elmer, Pe 141) beträgt $\pm 1^\circ$.

b) Drude-Gleichung

Die Beschreibung der Rotationsdispersion des Cyclododeka-peptids I und des Cyclohexapeptids II in DMF mit Hilfe der Drude-Gleichung ist nicht möglich. Bei Auftragung von $[\alpha]_\lambda^2$ gegen $[\alpha]$ ergab sich bei keinem von beiden eine Gerade. Die Rotationsdispersion beider Cyclopeptide ist also komplex. (Abb.4)

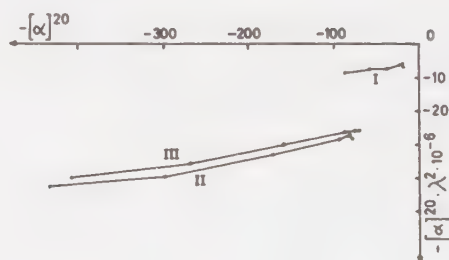


Abb. 4 Rotationsdispersion in DMF
nach Drude

Eine entsprechende Auftragung der Meßwerte für das c-(gly-L-phe-gly)₂ (III) in DMF (Meßwerte aus(59)) führte eben-

VII. Rotationsdispersion

falls zu einer nicht linearen Kurve (Abb.4), im Gegensatz zu anderen Angaben (52), wonach sich für dieses Peptid eine Gerade mit einem λ_c -Wert von 246 nm ergeben soll.

Wird die Drude-Gleichung auf die Rotationsdispersion der dichloressigsäuren Lösungen der Peptide I und II angewendet, so erweist sich diese ebenfalls als komplex, d.h. die Gleichung wird nicht erfüllt (Abb.5). Für III ist bereits früher eine komplexe Rotationsdispersion in DCE festgestellt worden (41).

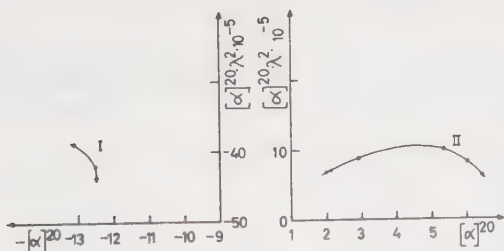


Abb. 5 Rotationsdispersion in DCE nach Drude

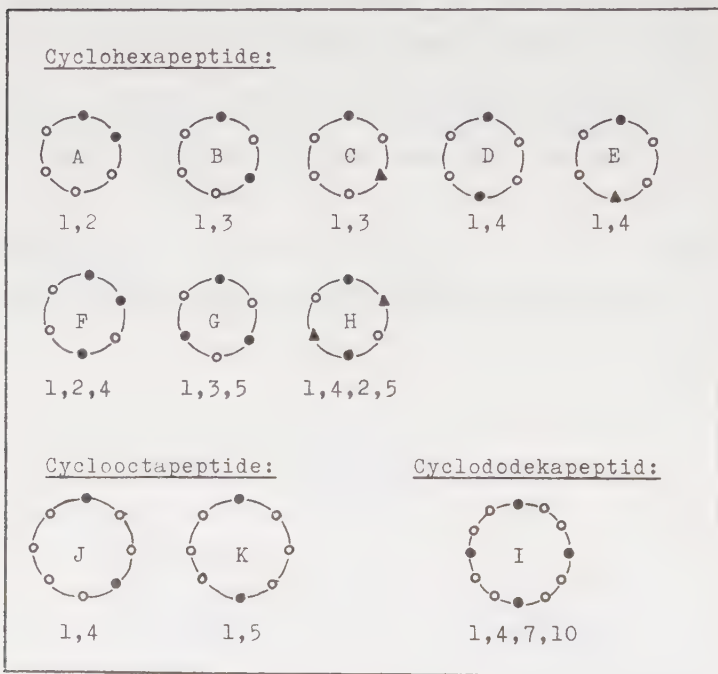
c) Uebersicht über die Rotationsdispersion einiger anderer Cyclopeptide

In diesem Abschnitt wird eine vergleichende Uebersicht über die Rotationsdispersion von insgesamt 24 Cyclopeptiden gegeben (21 Cyclohexapeptide ⁺), 2 Cyclooctapeptide ⁺), sowie

⁺) Diese Cyclopeptide wurden von Mitarbeitern des hiesigen Instituts synthetisiert und vermessen. Die in der Tab. 2 verwendeten Daten sind den jeweiligen Arbeiten entnommen.

VII. Rotationsdispersion

das in dieser Arbeit näher beschriebene Cyclododekapeptid I



Schema 2: Ringtypen und Sequenzen einiger Cyclopeptide.

Rotationsdispersionen in DMF

Alle Cyclopeptide sind mit Ausnahme des einen Octapeptids (J/a,a) linksdrehend.

Die Drehwerte bei 589 nm sind im allgemeinen groß, sie schwanken etwa zwischen -60 und -100° . Eine Sonderstellung nehmen hier die Peptide des Typs A (1,2-sequent) und die beiden Cyclooctapeptide (J und K) ein mit Drehwerten von

VII. Rotationsdispersion

nur etwa -20° . Eine besonders hohe Drehung besitzt D/ff. Die Rotationsdispersion ist bei fast allen mehr oder weniger stark ausgeprägt (d.h. starke Abhängigkeit des Drehvermögens von der Wellenlänge). Die 1,2-sequenten Cyclohexapeptide bilden auch hierin eine Ausnahme: sie zeigen einen relativ flachen Kurvenverlauf (schwächere Rotationsdispersion).

●,▲	L-Aminosäure ($-\text{NH}-\underset{\text{R}}{\text{CH}}-\text{CO}-$)	Seitenketten
a	Phenylalanin	$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$
b	p-Nitro-phenylalanin	$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$
c	Tyrosin	$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$
d	O-(2.4-Dinitrophenyl)-tyrosin	$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2$
e	O-(3.5-Dinitrobenzoyl)-tyrosin	$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2$
f	O-(N-Phthalyl-L-phenylalanyl)-tyrosin	$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{CO}-\underset{\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5}{\text{CH}}-\text{N}(\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_5)_2$
g	S-Benzyl-cystein	$-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$
h	Glutaminsäure	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$
i	Glutaminsäure- γ -methyl ester	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$
j	Glutaminsäure- γ -benzyl ester	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$

Tab. 1 L-Aminosäuren der Cyclopeptide

VII. Rotationsdispersion

Auffallend ist, daß die Phenylalanin- und Tyrosinhexapeptide mit 1,3- bzw. 1,4-Sequenz (Typen B und D) sowie die entsprechenden gemischten Peptide (Phenylalanin und Tyrosin im Ring, Typen C und E) im ganzen Meßbereich dieselben Drehwerte haben. Selbst das Cyclohexapeptid mit 3 Phenylalaninresten im Ring (Typ G) unterscheidet sich nicht von den eben genannten (59).

Rotationsdispersion in DCE

Die Drehwerte sind in der Mehrzahl der Fälle positiv. Die Absolutwerte sind allgemein ziemlich klein, die der 1,4-sequenten Cyclohexapeptide mit natürlichen Aminosäuren oder deren Estern (Phenylalanin, Tyrosin, Glutaminsäure, Glutaminsäure- γ -methylester) sogar sehr klein.

Nur das Peptid D/ff (O-(N-phthalyl-L-phenylalanyl)-L-tyrosin als optisch aktive Aminosäure) besitzt ein hohes Drehvermögen. (Auch in DMF nimmt es eine Sonderstellung ein, s. vorigen Abschnitt).

Auffallend ist die durchweg schwach ausgeprägte Rotationsdispersion der 1,4-sequenten Peptide. Dagegen zeigen die Hexapeptide mit 3 oder 4 L-Aminosäuren im Ring (Typen F,G, H) sowie die Cyclooctapeptide (J,K) eine mehr oder weniger starke Rotationsdispersion.

Cyclopeptid		Rotationsdispersion in DMF				Rotationsdispersion in DCE				$\Delta[\alpha]^{1)}$	Literatur		
Typ	Seitenketten	$[\alpha]_{589}$	stark	mittel	schwach	λ_c	$[\alpha]_{589}$	stark	mittel	schwach	λ_c		
A	a,a c,c	- 20 - 21		x		²⁾	+ 8 + 9		x		²⁾	-28 -30	(59) (40)
B	a,a c,c	- 75 - 63,5	x			²⁾	+ 17 + 31		x		²⁾	-92 -94,5	(59) (40)
C	a,c c,a	- 75 - 74	x			²⁾ ²⁾	+ 24 + 17		x		²⁾ ²⁾	-99 -91	(59) (59)
D	a,a b,b c,c d,d e,e f,f h,h i,i j,j	- 74 -105 ³⁾ - 80 - 59 ³⁾ ~ -160 ³⁾ - 16 - 40 - 30	x x x x xx x x x			²⁾ 241 - 255 236 257 255	+ 2 - 36 ³⁾ + 2 ~ - 6,5 ³⁾ ~ - 104 ³⁾ ~ 0 ~ 0 -(?)		xx x x x x x x		²⁾ 40 - ~270 224 243 - - -	-76 -69 -82 ~ -52,5 -56 -16 -40	(39,59), diese (52) [Arbeit (40), dies. Arb. (60) (60) (60) (41) (41)
E	a,c a,b c,g	- 71 - 88 ³⁾ - 66	x x			²⁾ 260	+ 2 - 18 ³⁾ + 9			x x x	²⁾ ~240	-73 -70 -75	(59) (52) (40)
F	a,a,a	-112	xx			²⁾	- 34	x			²⁾	-78	(59)
G	a,a,a	- 76	x			²⁾	+ 29		x		²⁾	-105	(59)
H	a,a,i,i	- 90	x			264	~ - 40	x			-	~ -50	(41)
J	a,a	+ 18	x			²⁾	+ 39	xx			²⁾	-21	(59)
K	a,a	- 23	x			²⁾	+ 24	x	(stärker als in DMF)		²⁾	-47	(59)
I	c,c,c,c	- 20			x	-	- 12,5		x		-	-7,5	diese Arbeit

Tab. 2 Uebersicht über die Rotationsdispersion einiger Cyclopeptide in DMF und DCE

Anmerkungen:

~ : Soweit in den zitierten Arbeiten keine Meßwerte angegeben waren, wurden die hier aufgeführten Werte aus den entsprechenden Abbildungen ermittelt.

- : in der Spalte λ_c : Drude-Gleichung wird nicht erfüllt.

¹⁾ : $\Delta[\alpha] = [\alpha]_{DMF} - [\alpha]_{DCE}$

²⁾ : in der vorliegenden Arbeit festgestellt unter Verwendung der Meßwerte aus (59).

³⁾ : Wert für $[\alpha]_{578}$.

VII. Rotationsdispersion

Vergleich der Rotationsdispersionen in DMF und DCE:

Der auffallendste Unterschied zwischen den spezifischen Drehungen bei 589 nm bzw. den Rotationsdispersionen in DMF und DCE ist folgender:

Sowohl das Drehvermögen der Cyclohexapeptide als auch die Abhängigkeit ihrer spezifischen Drehungen von der Wellenlänge sind in DCE stets *geringer* als in DMF (kleinere Werte für $[\alpha]$, flacherer Kurvenverlauf).

Da alle Cyclohexapeptide in DMF negative Drehwerte haben, ergibt sich, daß die Rotationsdispersionskurven der Cyclopeptide in DCE stets oberhalb der DMF-Kurven verlaufen müssen. Die spez. Drehungen in DCE sind also gegenüber denen in DMF in Richtung auf positive Werte verschoben. (In vielen Fällen findet man in DCE positive Drehwerte, s. Tab. 2). Diese Verschiebung soll durch

$$\Delta[\alpha] = [\alpha]_{\text{DMF}} - [\alpha]_{\text{DCE}}$$

charakterisiert werden. $\Delta[\alpha]$ ist in den untersuchten Fällen immer *negativ*, da $[\alpha]_{\text{DMF}}$ negativ und größer als $[\alpha]_{\text{DCE}}$ ist.

Bei Polypeptiden ist eine solche Regelmäßigkeit in der Aenderung der Drehungen bekannt (100). Ihr Drehvermögen in DCE ist ebenfalls kleiner als das in DMF. Da aber $[\alpha]_{\text{DMF}}$ der Polypeptide aus L-Aminosäuren positiv ist, ergibt sich für $[\alpha]_{\text{DCE}}$ eine Verschiebung in Richtung auf negative Werte. ($\Delta[\alpha]$ wäre also für Polypeptide stets positiv, da $[\alpha]_{\text{DMF}}$

VII. Rotationsdispersion

positiv und größer als $[\alpha]_{\text{DCE}}$ ist.)

Bei den Cyclooctapeptiden sind die Drehungen in DCE gegenüber denen in DMF ebenfalls in Richtung auf positive Werte verschoben. Im Gegensatz zu den Cyclohexapeptiden ist aber bei ihnen die Rotationsdispersion in DCE stärker ausgeprägt als in DMF.

Weitere Unterschiede zeigen sich bei der Betrachtung der einzelnen Cyclopeptide:

$\Delta[\alpha]$ ist bei den 1,2-sequenten Hexapeptiden (Typ A) und bei den Octapeptiden bedeutend kleiner als bei den 1,3- und 1,4-sequenten Typen (B,C,D,E) mit den gleichen L-Aminosäuren (a,c). Die starke Ähnlichkeit der 1,3- und 1,4-sequenten Phenylalanin- bzw. Tyrosinpeptide in DMF ist in DCE kaum noch vorhanden.

Drude-Konstanten

Die Anwendbarkeit der Drude-Gleichung auf die Rotationsdispersion wurde insgesamt bei zwanzig der hier erwähnten Cyclopeptide geprüft ^{+) (s.Tab.2)}. Es zeigt sich, daß die Rotationsdispersion der meisten Cyclopeptide in DMF - gleich welcher Sequenz und Ringgliederzahl - komplex ist, d.h. durch die Drude-Gleichung nicht beschrieben werden kann.

^{+) Soweit noch nicht in früheren Arbeiten geschehen (41,52, 60), erfolgte es im Laufe dieser Arbeit unter Verwendung der Meßwerte aus der Diss. von W. Grimm (59).}

VII. Rotationsdispersion

Nur die (1,4-sequenten) Cyclohexapeptide mit ungewöhnlichen Seitenketten (d.h. solchen, die in natürlichen Aminosäuren nicht vorkommen, also b,d,e,f; s.Tab.1) und evtl. Cyclohexapeptide, die Glutaminsäure oder deren Ester (h,i,j) enthalten (nur für die Wellenlängen 500-700 nm geprüft), erfüllen die Drude-Gleichung. Sie haben λ_c -Werte zwischen 240 und 265 nm.

Entsprechendes gilt für die dichloressigsäuren Lösungen der Cyclopeptide: Die Cyclohexa-, -octa- und -dodekapeptide mit Phenylalanin oder Tyrosin erfüllen die Gleichung nicht, die anderen mit den Seitenketten b,d,e,f erfüllen die Gleichung, ihre λ_c -Werte schwanken zwischen 40 und 270 nm.

d) Vergleich des Cyclododekapeptids mit den übrigen Cyclopeptiden

Das Cyclododekapeptid I unterscheidet sich trotz seines analogen Aufbaus (gleiche L-Aminosäure, gleiche Sequenz, Unterschied nur in der Größe des Ringes) deutlich von dem Cyclohexapeptid II und von allen übrigen Cyclopeptiden. Die Drehwerte in DMF sind bei allen Wellenlängen wesentlich kleiner als die der Hexapeptide, insbesondere derjenigen mit 1,3- und 1,4-Sequenz. Die Rotationsdispersion in DMF ist beim Cyclododekapeptid als einzigem Cyclopeptid schwach ausgeprägt. Auch in Dichloressigsäure unterscheidet es sich von den sequenzanalogen Hexapeptiden, sein Drehvermögen ist größer und die Rotationsdispersion allem Anschein nach

VII. Rotationsdispersion

(s.S.35) stärker ausgeprägt als bei den meisten der Hexapeptide (abgesehen von D/bb und D/ff). Auffallend ist auch der niedrige Wert von $\Delta[\alpha]$. Eine Uebereinstimmung mit den übrigen Cyclopeptiden besteht nur insofern, als die Drehwerte in DCE, verglichen mit denen in DMF, in Richtung auf positive Werte verschoben sind.

3. Zeitabhängigkeit der spezifischen Drehung

Bei der Messung der spezifischen Drehung des in DCE gelösten Cyclohexapeptids (II) wurde eine Zeitabhängigkeit festgestellt (Abb.6).

Im Laufe von 40 Minuten nach dem Auflösen der Substanz stieg die Drehung bis auf 65° an und nahm dann langsam aber stetig ab. Nach 10 Stunden war ein Endwert von $1,8^\circ$ erreicht. Dieser Drehwert blieb über mehrere Tage konstant.

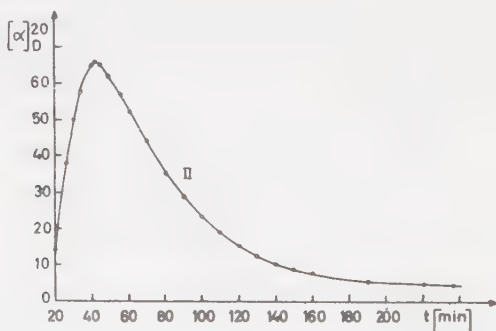


Abb. 6 Zeitabhängigkeit der spezifischen Drehung in DCE

VII. Rotationsdispersion

Die Probe war vor dem Auflösen aus Wasser umkristallisiert worden. Wurde die Substanz, nachdem sich der konstante Drehwert eingestellt hatte, aus der dichloressigsäuren Lösung mit Aether ausgefällt, getrocknet und wieder in DCE gelöst, so zeigte sie sofort eine spezifische Drehung von $+1,8^\circ$.

D. Heinicke hat Entsprechendes beim $c\text{-(gly-L-glu-gly)}_2\text{-}\gamma,\gamma'\text{-dimethylester}$, allerdings in DMF, gefunden (41).

Beim(linearen) Poly-L-prolin ist ebenfalls eine Zeitabhängigkeit der spezifischen Drehung beobachtet worden und zwar in Essigsäure, Ameisensäure und Wasser. Der Anfangsdrehwert ist klein und negativ und steigt im Laufe einiger Stunden auf einen ziemlich hohen positiven Wert an, der sich dann nicht weiter verändert; die Kurve hat - im Gegensatz zur obigen - kein Maximum (117).

VIII. Diskussion

1. Zur optischen Inaktivität 1,4-sequenter, symmetrischer Cyclopeptide

Das cyclische Dodekapeptid $c\text{-(gly-L-tyr-gly)}_4$ (I) zeigt in Dichloressigsäure eine spezifische Drehung von $-12,5^\circ$ (589 nm). Damit ist eindeutig bewiesen, daß eine bestimmte symmetrische Anordnung der L-Aminosäuren im Ring (1,4-Sequenz bei gleichzeitiger diametraler Stellung, s. Schema 2 S.39, Typ D und I) die optische Aktivität keinesfalls beseitigt, was ursprünglich angenommen worden war ((40,67); s. auch S.6).

Auch die entsprechenden Cyclohexapeptide sind optisch aktiv: Die Messungen der spezifischen Drehung des $c\text{-(gly-L-tyr-gly)}_2$ (II) und des $c\text{-(gly-L-phe-gly)}_2$ (III) in DCE bei verschiedenen Wellenlängen ergaben - im Gegensatz zu früheren Befunden (39,40,52) - für beide Cyclopeptide das Bild einer normalen Rotationsdispersion mit kleinen Drehwerten (s. Abb.3 S.36).

Die ursprünglich vertretene Hypothese, die optische Inaktivität solcher 1,4-sequenter Cyclopeptide sei durch eine unter dem Einfluß der DCE vorübergehend auftretende planare Konfiguration der asymmetrischen (α -) C-Atome und eine daraus resultierende Symmetrie des Moleküls zu erklären (50,66,67), ist damit gegenstandslos geworden.

VIII. Diskussion

2. Konformationsprobleme

a) Einfluß der Ringgröße

Die Tatsache, daß sich das Cyclododekapeptid I trotz seines analogen Aufbaus in bezug auf die Rotationsdispersion deutlich von II und den übrigen hier erwähnten Cyclohexapeptiden unterscheidet, legt die Annahme nahe, daß die Ringgliederzahl einen wesentlichen Einfluß auf das optische Verhalten hat. Auch die Octapeptide verhalten sich in dieser Hinsicht schon merklich anders als die Cyclohexapeptide, was ebenfalls auf einen Einfluß der Ringgröße hindeutet. Wahrscheinlich sind für Cyclopeptide ebenso wie für lineare Polypeptide grundsätzlich mehrere Konformationen möglich, die je nach der Ringgröße mehr oder weniger begünstigt sind (s.S.52).

b) Sequenz- und Seitenketteneinflüsse

Die auffallende Ähnlichkeit der 1,3-, 1,4- und 1,3,5-sequenten Cyclohexapeptide mit Phenylalanin oder Tyrosin als optisch aktiver Aminosäure machen einen besonderen Einfluß der Sequenz auf die Rotationsdispersion unwahrscheinlich. Bei Annahme eines direkten Zusammenhanges zwischen Rotationsdispersion und Konformation folgt daraus, daß diese Cyclopeptide alle in der gleichen Konformation vorliegen. Das abweichende Verhalten der 1,2-(bzw. 1,2,4-) sequenten Peptide läge dann im Auftreten einer etwas veränderten Konformation begründet. Das könnte da-

VII. D i s k u s s i o n

mit erklärt werden, daß durch die Nachbarstellung der relativ großen Seitenketten eine Störung der sonst bevorzugten Konformation eintritt.

Der Einfluß gewisser Seitenketten (b,d,e,f, evtl. auch h und j) auf die Rotationsdispersion zeigt sich bei der Anwendung der Drude-Gleichung. Die Cyclopeptide mit diesen Seitenketten sind die einzigen, welche die Drude-Gleichung erfüllen (s.Tab.2 und S.44). Es scheint jedoch fraglich und kann auf Grund des vorliegenden Materials auch nicht entschieden werden, ob dieser Einfluß auf die Rotationsdispersion gleichbedeutend ist mit einem Einfluß auf die Konformation. Die Tatsache, daß die Drude-Gleichung nur für Cyclopeptide mit nicht-natürlichen Seitenketten eine Konstante liefert, deren Beziehung zur Konformation fraglich (wenn überhaupt vorhanden) ist, zeigt, daß durch Anwendung dieser Gleichung kein Aufschluß über die Konformation erhalten werden kann.

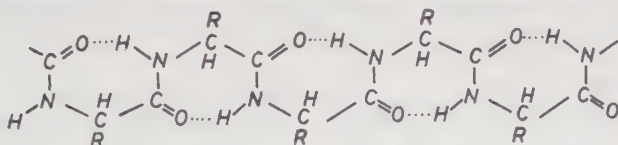
c) Konformationsmodelle

Bisher wurden für Cyclopeptide folgende Konformationen vorgeschlagen:

- aa) Ringe, in denen die CO-NH-Gruppe cis-Anordnung hat und sämtliche Wasserstoffbrücken intermolekular abgesättigt sind (94).
- bb) Ringe, in denen eine maximale intramolekulare Wasserstoffbrückenabsättigung vorliegt. In diesem Fall müßte die Peptidkette im Ring nach Art

VIII. Diskussion

der Bamford'schen α -Form (119) gefaltet sein.



cc) Ringe, in denen 2 antiparallel zueinander angeordnete Ketten an den Enden durch je einen Aminoacylrest unter Ringbildung verknüpft sind (63):

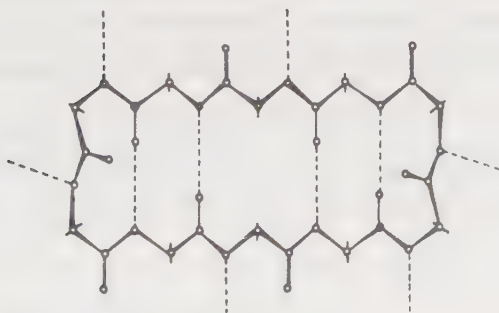


Abb.7 Gestreckte Konformation von Cyclopeptiden

Diese Konformation entspricht der gestreckten (β -) Form von Polypeptidketten. Die H-Brücken sind teils intra- (transanular) teils intermolekular abgesättigt. Alle Peptidbindungen sind trans-verknüpft.

Zu aa) Eine derartige Konformation ist höchst unwahrscheinlich, da die IR-Spektren aller Cyclopeptide (außer beim

VII. D i s k u s s i o n

Cyclodi-peptid = Diketopiperazin) für das Vorliegen der trans-Konfiguration sprechen (s.S.26). Die trans-Verknüpfung ist energetisch begünstigt.

Zu bb) Eine solche Form läßt sich am Modell für Cyclopeptide mit 4 oder mehr Aminosäureeinheiten realisieren und zwar mit trans-Verknüpfung der CO-NH-Gruppe. Aus diesem Grunde wurde sie mehrfach diskutiert (5,118). Ein so gefaltetes Cyclopeptid hätte eine relativ starre, kreisrunde Gestalt.

Die CO-NH-Gruppen sind bei einer solchen Faltung der Peptidkette nicht planar angeordnet. Pauling und Corey hatten aber durch röntgenographische Untersuchungen an Polypeptiden gezeigt, daß die CO- und die NH-Gruppe auf Grund des etwa 50%igen Doppelbindungscharakters der Peptidbindung coplanar sein müssen; die Theorie der α -Faltung wurde damit widerlegt.

Es besteht kein Grund zu der Annahme, daß die Verhältnisse bei cyclischen Peptiden grundsätzlich andere sind, die Cyclopeptide also eine solche energetisch ungünstige Konformation besitzen. Außerdem dürfte sich, für den Fall, daß sie in der gefalteten Form vorlägen, kein besonderer Unterschied in der Rotationsdispersion von Ringen verschiedener Größe bemerkbar machen.

Aus diesen Gründen scheidet die α -Form als mögliche Konformation für Cyclopeptide aus.

Zu cc) Auf röntgenographischem Wege wurde bewiesen, daß das Gramacidin S (ein Cyclodekapeptid) in dieser Konformation

VIII. Diskussion

(Abb.7) vorliegt (4 transanulare, 4 intermolekulare H-Brücken pro Ringmolekül) (63).

Betrachtungen am Kalottenmodell zeigen, daß eine solche Konformation bei Cyclopeptiden nur dann möglich ist, wenn die Anzahl von Aminosäuren im Ring ($2n$) das Doppelte einer ungeraden Zahl beträgt ($n = 3, 5, \dots$) d.h., daß nur unter dieser Bedingung der Aufbau eines ebenen, spannungsfreien Ringes mit planaren, trans-konfigurierten CO-NH-Gruppen gelingt. Cyclohexapeptide ($n = 3$) können also in der beschriebenen Weise aufgebaut sein; diese Konformation wird auch als wahrscheinlich angesehen (49).

Für das cyclische Dodekapeptid ist diese Konformation nur dann möglich, wenn man annimmt, daß der Ring entweder eine cis-konfigurierte oder einige nicht planare CO-NH-Gruppen enthält. Die nicht planaren Peptidbindungen scheiden aus energetischen Gründen aus (s.o.)

Trotz dieser Einschränkung muß für das Cyclododekapeptid (ebenso wie für die cyclischen Octapeptide) die gestreckte Konformation als die wahrscheinlichste angesehen werden. Das Vorhandensein von cis-Peptidbindungen bedeutet dann eine "Störung" der in Abb. 7 gezeigten "idealen" Konformation. (Ein Widerspruch zu der anhand des IR-Spektrums gemachten Aussage über das Vorliegen von trans-Bindungen (S.26) ergibt sich deswegen nicht, da auch in der gestörten Konformation die trans-Bindungen überwiegen.).

VIII. Diskussion

Diese Störung zeigt sich deutlich im Rotationsdispersionsverhalten des Cyclododekaeptids, das von dem der Hexapeptide erheblich abweicht (S.44). Auch seine für Cyclopeptide auffallend schlechte Kristallisationsfähigkeit kann in der gestörten Konformation seine Ursache haben.

Eine endgültige Klärung dieser Fragen kann nur durch Röntgenstrukturanalysen erreicht werden.

d) Konformationsunterschiede in DMF und DCE

Die Gleichsinnigkeit in der Änderung der Rotationsdispersion beim Uebergang von DMF zu DCE als Lösungsmittel legt die Vermutung nahe, daß in DCE eine andere Konformation vorliegt als in DMF. D.h., ähnlich wie es bei Polypeptiden der Fall ist, werden in DCE die intra- bzw. intermolekularen H-Brücken (die die Konformation in festem Zustand oder auch in DMF bestimmen) gelöst unter Ausbildung neuer H-Brücken zwischen den Ring- und Lösungsmittelmolekülen.

Eine Unterscheidung etwa zwischen "geordneten" und "ungeordneten" Strukturen (analog den Verhältnissen bei linearen Polypeptiden) ist aber anhand des vorliegenden Materials noch nicht möglich.

Bei Polypeptiden gelingt die Unterscheidung mit Hilfe der Moffitt-Gleichung (S.30) die aber auf Cyclopeptide nicht anwendbar ist. Auch die Drude-Gleichung erlaubt bei Cyclopeptiden keine Aussage über die Konformation, wie auf S.43 gezeigt wurde.

VIII. D i s k u s s i o n

Die Konformationsänderungen der Cyclopeptide in DCE müssen nicht unbedingt zu einer U n o r d n u n g der Moleküle führen, man kann sich auch vorstellen, daß die zwischen Peptidbindungen und Lösungsmittelmolekülen entstehenden Assoziate sehr wohl eine gewisse Ordnung haben, daß sich z.B. eine Art von Einschlußverbindung bildet.

Diese Ordnung müßte allerdings in beträchtlichem Maße von der Größe der Ringe abhängen. Tatsächlich zeigt sich ein solcher Einfluß im Rotationsdispersionsverhalten der Cyclopeptide; da man aber einen direkten Zusammenhang zwischen Rotationsdispersion und Konformation annehmen kann, folgt daraus, daß die Ringgröße auch auf die Konformation ("Ordnung") der Cyclopeptide in DCE von Einfluß ist.

e) Zeitabhängigkeit

Beim Poly-L-prolin konnte eindeutig geklärt werden, daß die Drehbetragsänderung auf einer Umwandlung der cis-konfigurierten, rechtsgewendelten Helix ("Polyprolin I") in die trans-konfigurierte, linksgewendelte Helix ("Polyprolin II") beruht.

Obwohl angenommen werden kann, daß die Zeitabhängigkeit von $[\alpha]$ auch bei Cyclopeptiden durch Konformationsänderungen bedingt ist, läßt sich eine analoge Erklärung nicht geben. Eine cis-trans-Isomerisierung ist nicht anzunehmen, da das feste, aus Wasser umkristallisierte Cyclohexapeptid,

VIII. D i s k u s s i o n

das den Effekt zeigt, in der trans-Konfiguration vorliegt (s. IR-Spektrum, S.26)

Auch nach den obigen Ueberlegungen zur Konformation (s. unter cc), S.52) ist eine trans-Form für die Cyclohexapeptide anzunehmen. Eine Umwandlung in der Lösung in die cis-konfigurierte Form ist aber unwahrscheinlich, da die trans-Form im allgemeinen energetisch begünstigt ist, zur Isomerisierung also ein gewisser Energieaufwand nötig wäre.

IX. Experimenteller Teil

1. Präparatives +)

Die Verbindungen 1-10 wurden - mit einigen Aenderungen - nach den Vorschriften von H.Rauhut (40) dargestellt.

1) N-Trityl-glycyl-L-tyrosin-äthylester

Umsetzung von N-Tritylglycin (83) mit Chlorkohlensäure-äthylester zum gemischten Anhydrid, Kupplung mit L-Tyrosin-äthylester (126).

Ausbeute 65-70% d.Theorie.

Fp 158°C (Aethanol) $[\alpha]_D^{20} = + 25^\circ$ (c = 1, THF)

Lit.Fp 158° $[\alpha]_D^{20} = + 25,7^\circ$ (c = 4, THF)

2) N-Trityl-glycyl-L-tyrosin

Verseifung von 1) mit 1 n NaOH. Das ölige Rohprodukt wurde von H.Rauhut (40) nicht weiter gereinigt.

10 g des über P_2O_5 i.V. getrockneten Oeles wurden in 10 ml kaltem abs. Dioxan gelöst, die Substanz kristallisierte spontan in Form weißer Nadeln. Es wurde einmal aus Aethanol umkristallisiert.

Ausbeute 85-88% d.Theorie

Fp 163-165°C (Z) $[\alpha]_D^{25} = -6^\circ$ (c = 1, Dioxan)

3) N-Trityl-glycyl-L-tyrosin-cyanmethylester

Umsetzung von 2) mit Chloracetonitril und Triäthylamin unter Zugabe von wenig abs. Dioxan als Lösungsvermittler.

Ausbeute 85-90% d.Theorie

Fp 191-193°C (Methanol) $[\alpha]_D^{25} = -5^\circ$ (c = 1, THF)

Lit.Fp 193° $[\alpha]_D^{23} = 3,8^\circ$ (c = 2,35, THF)

+) Verwendete Abkürzungen: Tt = Triphenylmethyl-; OEt = -äthylester; OCy = -cyanmethylester (-OCH₂-CN); ClAN = Chloracetonitril; TAA = Triäthylemin; Aminoacylreste (89): gly = glycyl(-NH-CH₂-CO-) tyr = tyrosyl (-NH-CH(CO-C₆H₄-OH)-)

IX. Experimenteller Teil

4) N-Trityl-glycyl-L-tyrosyl-glycin-äthylester

Kupplung von 3) mit Glycinäthylester·HCl (125) in Gegenwart von Triäthylamin in abs. Tetrahydrofuran.

Ausbeute 80-85% d. Theorie.

Fp. 181°C (Aethanol) $[\alpha]_D^{20} = + 11$ (c = 1, THF)

Lit.Fp 180° $[\alpha]_D^{20} = + 10,6$ (c = 1,3 THF)

5) N-Trityl-glycyl-L-tyrosyl-glycin

Verseifung von 4) mit 1 n NaOH. Von H.Rauhut (40) als Oel weiterverarbeitet.

Kristallisation durch mehrmaliges Lösen des Oels in Methanol und langsames Einengen der Lösung i.V. bei 30°. Umkristallisation aus Methanol. Weiße Nadeln.

Ausbeute 85-90% d. Theorie

Fp. 218°C (Z) $[\alpha]_D^{25} = + 9,5^\circ$ (c = 1, Dioxan)

$C_{32}H_{31}O_5N_3$ M = 537,624

Berechnet: C 71,33 H 5,82 N 7,82

Gefunden : 71,05 5,65 7,75

6) N-Trityl-glycyl-L-tyrosyl-glycin-cyanmethylester

Aus 5) durch Umsetzen mit Chloracetonitril und Triäthylamin in wenig abs. Dioxan.

Ausbeute 70-75% d. Theorie

Fp. 104-106°C (Methanol) $[\alpha]_D^{20} = + 14,5^\circ$ (c = 1, THF)

Lit.Fp. 105°C $[\alpha]_D^{18} = + 14,2^\circ$ (c = 1, THF)

7) Glycyl-L-tyrosyl-glycin-äthylester · HCl

Aus 5) durch Abspaltung der Tritylgruppe mit äthanolischer Salzsäure (1 n).

Ausbeute (roh) 95% d. Theorie.

IX. Experimenteller Teil

8) N-Trityl-glycyl-L-tyrosyl-diglycyl-L-tyrosyl-glycin-äthylester

Kupplung von 6) und 7) in abs. Dimethylformamid in Gegenwart von Triäthylamin.

Ausbeute 70-75% d. Theorie

Fp. 200-202°C (70%iges Aethanol) $[\alpha]_D^{20} = -3^\circ$ (c = 1, DMF)

Lit.Fp. 201°C $[\alpha]_D^{18} = -2,5^\circ$ (c = 1, DMF)

9) N-Trityl-glycyl-L-tyrosyl-diglycyl-L-tyrosyl-glycin

Verseifung von 8) mit 1 n NaOH. Als Oel beschrieben (40). Zweimaliges Lösen des Oels in Methanol und langsames Einengen i.V. bei 30° ergab teilweise kristallines Produkt. Durch Umkristallisation aus Methanol/H₂O wurde es in rein weißen Kristallen erhalten.

Ausbeute 85-90% d. Theorie.

Fp. 156-158°C (Z) $[\alpha]_D^{25} = -7,5^\circ$ (c = 0,1, DMF)

C₄₅H₄₆O₉N₆ M = 814,911

Berechnet: C 66,33 H 5,69 N 10,32

Gefunden : 66,04 5,71 10,22

10) N-Trityl-glycyl-L-tyrosyl-diglycyl-L-tyrosyl-glycin-cyanmethylester

Umsetzung von 9) mit Chloracetonitril und Triäthylamin.

Ausbeute 76-78% d. Theorie.

Fp. 138-140°C (Z) (Aceton/Ather). $[\alpha]_D^{20} = -5,5^\circ$ (c = 1, DMF)

Lit.Fp. 140°C $[\alpha]_D^{18} = -5,4^\circ$ (c = 1, DMF)

11) Glycyl-L-tyrosyl-diglycyl-L-tyrosyl-glycin-äthylester·HCl

2,81 g (0,33·10⁻² Mol) N-Trityl-gly-L-tyr-digly-L-tyr-gly-äthylester wurden in 25 ml abs. Aethanol gelöst und mit 8 ml 1 n äthanolischer Salzsäure 15 Min. zum Sieden erhitzt.

IX. Experimenteller Teil

Dann wurde das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert, noch einmal 20 ml abs. Aethanol zugegeben und wieder im Vakuum abdestilliert. Der teilweise ölige Rückstand wurde sechs- bis achtmal mit wenig abs. Aether digeriert bis die Substanz als weißes, feines Pulver vorlag. Weitere Reinigung erfolgte durch Umfällen aus Aethanol/Aether und Trocknen über P_2O_5 und KOH im Vakuum bei $80^\circ C$. Die Substanz ist hygroscopisch.

Ausbeute 1,97g = 93% d.Theorie.

Fp $175^\circ C$ (Z) $[\alpha]_D^{25} = -19,2^\circ$ (c = 1, DMF)

$C_{28}H_{37}O_9N_6Cl$ M = 637,109

Berechnet: C 52,89 H 5,85 N 13,19

Gefunden : 53,27 5,76 12,87

12) N-Trityl-glycyl-L-tyrosyl-diglycyl-L-tyrosyl-diglycyl-L-tyrosyl-diglycyl-L-tyrosyl-glycin-äthylester

2,85 g ($0,33 \cdot 10^{-2}$ Mol) 10) und 2,12 g ($0,33 \cdot 10^{-2}$ Mol) 11) wurden in 20 ml abs. Dimethylformamid gelöst, 0,4 ml Triäthylamin (20% Ueberschuß) und 0,01 ml Eisessig zugegeben und 50-60 Stdn. geschüttelt. Danach wurde das Reaktionsgemisch in 400 ml Essigester und 100 ml Wasser unter Zugabe von wenig (10 ml) Aethanol aufgenommen und nacheinander mit gesättigten Lösungen von Zitronensäure, Natriumhydrogencarbonat und Natriumchlorid ausgeschüttelt, die Essigesterlösung über Natriumsulfat filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum bei $30-40^\circ C$ abdestilliert. Falls das Produkt während des Waschens ausfiel, wurde es abzentrifugiert und mit den Waschlösungen bzw. mit dest. Wasser bis zur negativen Chloridreaktion digeriert und zentrifugiert. Das Rohprodukt wurde mit Aether verrieben, getrocknet und zweimal aus Methanol umgelöst. Zum Schluß wurde einmal aus Methanol/Aether umgefällt und bei 60° im Vakuum über P_2O_5 getrocknet.

IX. Experimenteller Teil

Ausbeute 2,62 g = 55% d. Theorie

Fp 168-170°C $[\alpha]_D^{25} = -7,8^\circ$ (c = 1, DMF)

$C_{73}H_{80}O_{17}N_{12} \cdot H_2O$ M = 1415,555

Berechnet: C 61,94 H 5,84 N 11,87

Gefunden : 62,22 5,59 11,64

Nach dem Trocknen über P_2O_5 bei 110° i.V.:

$C_{73}H_{80}O_{17}N_{12}$ M = 1397,539

Berechnet: N 12,03

Gefunden : 12,09

13) N-Trityl-glycyl-L-tyrosyl-diglycyl-L-tyrosyl-diglycyl-L-tyrosyl-diglycyl-L-tyrosyl-glycin

472 mg ($0,33 \cdot 10^{-3}$ Mol) 12) wurden in 20 ml Methanol suspendiert, mit 2 ml 0,5 n NaOH (10^{-3} Mol) versetzt und 30 Min. gerührt. Die Substanz löste sich. Anschließend wurde mit Wasser auf das Dreifache verdünnt, von einer evtl. auftretenden Trübung abfiltriert und mit 10 ml 0,1 n HCl genau neutralisiert. Das dabei ausgefallene flockige oder gallertartige Produkt wurde solange mit dest. wasser digeriert und abzentrifugiert, bis kein Chlorid mehr nachzuweisen war. Weitere Reinigung erfolgte durch zweimaliges Umlösen aus Aethanol. Es wurde über P_2O_5 bei 60° im Vakuum getrocknet.

Ausbeute 340 mg = 73,5% d.Theorie

Fp 173-175°C $[\alpha]_D^{25} = -5,7^\circ$ (c = 1, DMF)

$C_{71}H_{76}O_{17}N_{12} \cdot H_2O$ M = 1387,501

Berechnet: C 61,46 H 5,67 N 12,11

Gefunden : 61,50 5,69 11,66

Nach dem Trocknen über P_2O_5 bei 110°C i.V.:

$C_{71}H_{76}O_{17}N_{12}$ M = 1369,485

Berechnet: N 12,28

Gefunden : 12,53

IX. Experimenteller Teil

14) N-Triäthylglycyl-L-tyrosyl-diglycyl-L-tyrosyl-diglycyl-L-tyrosyl-diglycyl-L-tyrosyl-glycin-cyanmethylester

462,5 mg ($0,33 \cdot 10^{-3}$ Mol) 13) wurden mit 0,18 ml Chloracetonitril, 0,5 ml Triäthylamin (jeweils 10facher Ueberschuß) und 1 ml abs. Dioxan ca. 30 Std. geschüttelt. Die Aufarbeitung erfolgte wie bei 12). Das Rohprodukt wurde erst in Anteilen von 50 mg aus Aethanol, dann aus Acetonitril/Aethanol (2:1) umgelöst und wie üblich getrocknet.

Ausbeute 292 mg = 61,5% d.Theorie.

Fp 185-187°C (Z) $[\alpha]_D^{25} = -18^\circ$ (c = 1, DMF)

$C_{73}H_{77}O_{17}N_{13} \cdot H_2O$ M = 1426,539

Berechnet: C 61,47 H 5,58 N 12,47

Gefunden: 61,59 5,41 12,20

Nach dem Trocknen über P_2O_5 bei 110° i.V.:

$C_{73}H_{77}O_{17}N_{13}$ M = 1408,523

Berechnet: N 12,93

Gefunden: 13,23

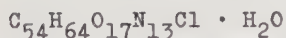
15) Glycyl-L-tyrosyl-diglycyl-L-tyrosyl-diglycyl-L-tyrosyl-diglycyl-L-tyrosyl-glycin-cyanmethylester · HCl

475,5 mg ($0,33 \cdot 10^{-3}$ Mol) 14) wurden in 7,5 ml abs. Acetonitril suspendiert und mit 2,5 ml (50% Ueberschuß) 2 n HCl in Acetonitril (frisch bereitet durch Sättigen von abs. Acetonitril mit Chlorwasserstoff während ca. 15 Min.) versetzt. Die Mischung wurde unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit 15-20 Min. lang bei ständigem Rühren zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden ca. 20 ml abs. Aether zugegeben, dekantiert, der Rückstand 6-8 mal mit abs. Aether verrieben und aus Acetonitril/Aethanol (2:1)/Aether umgefällt. Getrocknet wurde über P_2O_5 und KOH bei 100° i.V.

Ausbeute 354 mg = 87% d. Theorie

Fp 195°C (Z) $[\alpha]_D^{25} = -25,5^\circ$ (c = 1, DMF)

IX. Experimenteller Teil



$$M = 1220,683$$

Berechnet: N 14,92

Gefunden : 14,70

16) Cyclo-(glycyl-L-tyrosyl-diglycyl-L-tyrosyl-diglycyl-L-tyrosyl-diglycyl-L-tyrosyl-glycyl)

- a) 305 mg ($0,25 \cdot 10^{-3}$ Mol) 15) wurden in 10 ml abs. Dimethylformamid gelöst und im Verlauf von 6-8 Std. unter ständigem Rühren in 100 ml abs. 95° heißes Pyridin, dem 0,25 ml Eisessig zugesetzt waren, eingetropft. Der Ansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen.
- b) 305 mg ($0,25 \cdot 10^{-3}$ Mol) 15) wurden fein gepulvert, unter Rühren in 600 ml abs. Pyridin eingetragen, 6-8 Std. auf 95° erhitzt und ebenfalls 12-14 Std. bei Zimmertemperatur stehen gelassen.

Die Aufarbeitung erfolgte für a) und b) in derselben Weise: Das Pyridin wurde bei 40° i.V. bis fast zur Trockne eingengt, zweimal nacheinander ca. 60%iges Aethanol zugesetzt und ebenfalls i.V. abdestilliert. Umlösen des Rückstandes aus 60%igem Methanol mit Aktivkohle ergab ein öliges Produkt, durch Verreiben mit wenig Wasser konnte es verfestigt werden.

Rohausbeute: a) 81 mg = 28,7% d.Theorie

b) 122 mg = 43,3% d.Theorie

Reinigung

Säulenchromatographie: 1) 30 g Al_2O_3 sauer (Woelm), Länge der Säule 15 cm, Durchmesser 1,6 cm, vorgewaschen mit Methanol p.A. und mit 80%igem Methanol. Die Substanz wurde in ca. 5 ml 80%igem Methanol gelöst aufgetragen. Eluiert mit abs. Methanol, 80%igem Methanol, 50%igem Methanol, 50%iger Essigsäure. Die Fraktionen mit 80%igem und 50%igem Methanol wurden vereinigt und im Vakuum bis auf ca. 5 ml eingengt. Durch Zugabe von etwas Methanol wurde etwa ausgefallenes Produkt

IX. Experimenteller Teil

wieder in Lösung gebracht.

2) 30 g Al_2O_3 basisch (Woelm), Säulenabmessungen wie oben, vorgewaschen wie oben. Auftragen der bei 1) resultierenden Lösung. Elution wie oben.

Einengen der wäßrig-methanolischen Eluate i.V. bei 40° bis fast zur Trockne, abkühlen, absaugen. Nach dreimaligem Umkristallisieren aus tridest. Wasser resultieren winzige, schwach gelblich gefärbte Nadeln, die über P_2O_5 bei 60° i.V. getrocknet wurden.

Ausbeute a) 8,1 mg = 2,87% d. Theorie

b) 9,8 mg = 3,48% d. Theorie

Fp 264°C $[\alpha]_D^{25} = -26^\circ$ (c = 0,5, DMF)

$\text{C}_{52}\text{H}_{60}\text{O}_{16}\text{N}_{12} \cdot \text{H}_2\text{O}$ M = 1127,164

Berechnet: C 55,41 H 5,54 N 14,91

Gefunden : 55,16 5,51 14,63

Nach Trocknen über P_2O_5 bei 150° i.V.: Fp 245°C

$\text{C}_{52}\text{H}_{60}\text{O}_{16}\text{N}_{12}$ M = 1109,148

Berechnet: N 15,15

Gefunden : 15,35

Molekulargewichtsbestimmung nach R.Schwyzer (5):

3,5 mg c-(gly-L-tyr-gly) $_4$ ·H $_2$ O und 2,6 mg Diketopiperazin wurden in je ein kleines Wägegläschen eingewogen und in 1 ml reinster Trifluoressigsäure gelöst. Zur Einstellung des Gleichgewichts wurden sie im Vakuumexsiccator bei 25°C ca. 30 Std. stehen gelassen. Durch Wägen wurde die Konzentration der Diketopiperazinslösung (Einwaage E_1 , Lösungsgewicht L_1 , Molekulargewicht M_1) bestimmt und daraus und aus dem Gewicht der c-Dodekapeptidlösung (Einwaage E_2 , Lösungsgewicht L_2 , dessen Molekulargewicht (M_2) berechnet nach der Gleichung

$$M_2 = \frac{L_1 \cdot M_1 \cdot E_2}{E_1 \cdot L_2}$$

IX. Experimenteller Teil

5 Bestimmungen ergaben als Mittelwert 1168 ± 50 , berechnet 1127,2.

2. Meßwerte

a) Spezifische Drehungen:

$c\text{-(gly-L-tyr-gly)}_4 = \text{I}$, $c\text{-(gly-L-tyr-gly)}_2 = \text{II}$

$c\text{-(gly-L-phe-gly)}_2 = \text{III}$

Konzentration $c = 0,5 \text{ g/100 ml}$, $T = 20^\circ\text{C}$, soweit nichts anderes angegeben.

λ	in Dimethylformamid			in Dichloressigsäure		
	I	I(25°C)	II	I	II	III
589	-20	- 26	- 80	-12,5	+ 1,8	+ 2
578	-20,2	- 27	- 82	-12,5	+ 2,1	+ 2
546	-22,6	- 29,6	- 94,5	-13,1	+ 2,9	+ 2,5
436	-38,6	- 48,1	-174,5		+ 5,3	+ 3,5
364	-59,2	- 71,1	-297		+ 6	+ 4
313	-87	-100	-435		+ 6,4	+ 4

b) Zeitabhängigkeit der spezifischen Drehung von II in DCE:
 $\lambda = 589 \text{ nm}$, $T = 20^\circ\text{C}$. Zeit $t = \text{Minuten nach Zugabe des Lösungsmittels zur trockenen Substanz.}$

t	$[\alpha]_{589}^{20}$	t	$[\alpha]_{589}^{20}$	t	$[\alpha]_{589}^{20}$
20	14,3	48	62,9	110	18,6
25	25,7	50	61,9	130	13,1
27	38,1	54	59,9	150	8,7
29	46,2	58	54,6	165	7,4
30	49,6	62	50,8	190	5,1
32	53,4	66	47,2	205	4,4
34	57,2	70	43,9	235	3,7
36	61,0	74	39,8	365	3,1
38	63,9	78	37,5	500	2,7
40	64,9	82	34,3	600	2,2
43	65,1	90	28,6	700	1,8
45	63,4	100	23,2	800	1,8

IX. Experimenteller Teil

3. Meßbedingungen

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Apparat von Kofler unter Verwendung geeichter Thermometer bestimmt.

Zur Messung der spezifischen Drehungen wurde ein Polarimeter PE 141 der Fa. Perkin-Elmer mit Hg-Lichtquelle benutzt, Küvettenlänge 1 dm, Küvetteninhalt 1 ml. Die Fehlerbreite beträgt $\pm 1^\circ$.

Das IR-Spektrum wurde in einem Spektrographen der Fa. E. Leitz unter Verwendung eines NaCl-Prismas aufgenommen (Schreibgeschwindigkeit 1,5 min/ μ). Die Substanz wurde in fester Form (KBr-Preßlinge, Einwaage 2 mg Cyclopeptid/700 mg KBr) vermessen.

Für die Papierchromatogramme wurde das Papier Nr. 2043 b der Firma Schleicher und Schüll verwendet; Rundchromatogramme; Kammersättigung über Nacht, Laufstrecke 8 cm, Laufzeit ca. 2 Std.

Als Beschichtungsmaterial für Dünnschichtchromatogramme diente Kieselgel G von Merck; Schichtdicke 0,3 mm. Aufsteigende Methode, Kammersättigung 1 Std., Laufstrecke 10 cm, Laufzeit ca. 1 - 1 1/2 Std.

Das Pulverdiagramm ⁺⁾ wurde mit einem Zählrohrdiffraktometer (Philips) mit FeK_α -Strahlung aufgenommen. Zählrohrgeschwindigkeit 1°/min., Zählrohrspannung 1750 V.

Die Analysen wurden durchgeführt im Mikroanalytischen Labor des Organisch-Chemischen Instituts der Freien Univ. Berlin, im Mikroanalytischen Labor von Dr. F. Pascher u. E. Pascher, Bonn und im Mikroanalytischen Institut des Max-Planck-Instituts für Kohleforschung, Mülheim/Ruhr.

⁺⁾ Für die Aufnahme und Auswertung des Pulverdiagramms danke ich Herrn Dr. W. Franke vom Mineralogischen Institut der FU Berlin.

X. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein cyclisches Dodekapeptid, das $c\text{-(glycyl-L-tyrosyl-glycyl)}_4$ (I) synthetisiert und seine Eigenschaften beschrieben.

Die Synthese erfolgte in 16 Stufen über das lineare Dodekapeptid durch Cyclisierung eines aktiven Dodekapeptid-esters. Es zeigte sich, daß seine Reindarstellung wesentlich schwerer gelingt als die von Cyclohexapeptiden. Das wurde einmal auf die ungewöhnliche Größe des Ringes (36 Ringatome) und die damit verbundene Neigung zur Bildung von Einschlußverbindungen zurückgeführt, zum anderen auf die zahlreichen Möglichkeiten zur Bildung von Assoziaten (über H-Brücken) oder Komplexen mit Fremdmolekülen. Dazu kommt eine geringe Neigung zur Kristallisation, die durch eine "gestörte" Konformation (s.u.) bedingt sein könnte.

Das IR-Spektrum dieser Verbindung wurde aufgenommen, mit dem des bereits bekannten, sequenzanalogen Cyclohexapeptids $c\text{-(glycyl-L-tyrosyl-glycyl)}_2$ (II) verglichen und im Hinblick auf mögliche Aussagen über die Konformation diskutiert.

Die spezifische Drehung von I wurde in Abhängigkeit von der Wellenlänge (= Rotationsdispersion) im Bereich von 300-600 nm in verschiedenen Lösungsmitteln (Dimethylformamid und Dichloressigsäure) gemessen. Aus Gründen des Vergleichs wurden dieselben Messungen mit dem Cyclohexapeptid

X. Zusammenfassung

II durchgeführt, dessen Rotationsdispersion nur im Bereich von 500-700 nm beschrieben war.

Im Gegensatz zu früheren Aussagen ist II in DCE optisch aktiv.

Durch diesen Befund wurde es notwendig, auch die Rotationsdispersion des $c\text{-(gly-L-phe-gly)}_2$ (III) zu messen, bei dem ebenfalls keine optische Aktivität in DCE gefunden worden war. Auch dieses Peptid zeigt eine normale Rotationsdispersion in DCE.

Aus diesen Messungen folgt, daß die anlässlich der früheren (hiermit korrigierten) Befunde aufgestellte Hypothese über den Grund der optischen Inaktivität 1,4-sequenter Cyclohexapeptide in DCE gegenstandslos geworden ist.

Um zu allgemeineren Aussagen über den Zusammenhang zwischen Rotationsdispersion und Konformation zu gelangen, wurde einerseits die Anwendbarkeit der Drude-Gleichung auf die Rotationsdispersion einer Reihe von cyclischen Hexa- und Octapeptiden sowie auf die des Cyclododekapeptides geprüft, andererseits Material über die Rotationsdispersion von Cyclopeptiden gesammelt, in einer Uebersicht zusammengestellt und einer vergleichenden Betrachtung unterzogen. Diese Betrachtung führte zu folgenden Feststellungen bzw. Annahmen:

Es existiert ein deutlicher Zusammenhang zwischen Rota-

X. Zusammenfassung

tionsdispersion und Konformation. Die Drude-Gleichung scheint jedoch nicht geeignet zu sein, Kriterien für diesen Zusammenhang zu liefern.

Die Ringgröße hat einen starken Einfluß auf die Rotationsdispersion, die Sequenz einen auffallend geringen.

Daraus kann geschlossen werden, daß Ringe verschiedener Größe verschiedene Konformationen besitzen.

Ein Einfluß gewisser (nicht natürlicher) Seitenketten auf die Rotationsdispersion ist über die Drude-Konstanten festzustellen, ein Zusammenhang mit der Konformation ist hier jedoch unwahrscheinlich und wurde nicht näher untersucht.

Anhand von verschiedenen in der Literatur beschriebenen Konformationsmodellen für Cyclopeptide wurden die für Ringe verschiedener Größe jeweils bevorzugten Konformationen diskutiert.

Es wurde festgestellt, daß die für ein Cyclodekapeptid (Gramicidin S) bewiesene und für Cyclohexapeptide wahrscheinliche, gestreckte, nur trans-Peptidbindungen enthaltende Konformation nur dann möglich ist, wenn die Anzahl der Aminosäureeinheiten im Ring ($2n$) gleich dem Doppelten einer ungeraden Zahl ($n \geq 3$) ist.

Für das Cyclododekapeptid muß eine Konformation angenommen werden, in der der Ring ebenfalls gestreckt ist, d.h. aus zwei antiparallel zu einander angeordneten Ketten von je

X. Zusammenfassung

5 Aminosäureeinheiten besteht, die an den Enden durch je einen Aminosäurerest unter Ringbildung verknüpft sind. Die H-Brücken sind teils transanular, teils intermolekular abgesättigt. In diesem "gestreckten" Ring müssen aber, im Gegensatz zu der "idealen" Konformation des Gramacidin S, ein oder zwei Peptidbindungen cis-verknüpft sein ("gestörte" Konformation).

Beim Vergleich der Rotationsdispersionen der Cyclopeptide in DMF und DCE zeigte sich, daß die Änderung der spezifischen Drehungen nach einer bestimmten Regel zu erfolgen scheint:

Es ist anzunehmen, daß ebenso wie es bei linearen Polypeptiden der Fall ist, ein charakteristischer Unterschied in der Konformation der Cyclopeptide in diesen beiden Lösungsmitteln besteht. Es kann jedoch hier keine Aussage darüber gemacht werden, welcher Art die Konformation in DCE ist.

Beim Cyclohexapeptid II wurde in DCE eine Zeitabhängigkeit der spezifischen Drehung gefunden und deren Ursache diskutiert.

XI. Literaturverzeichnis

- 1) R.L.M.Synge, Biochem.J. 39, 363 (1945)
R.Consden, A.Gordon, A.J.P.Martin, R.L.M.Synge, Biochem.J. 41, 596 (1947)
- 2) F.Sanger, Biochem.J. 40, 261 (1946)
A.Paladini, L.C.Craig, J.Amer.chem.Soc. 76, 688 (1954)
T.P.King, L.C.Craig, J.Amer.chem.Soc. 77, 6627 (1955)
- 3) K.Vogler, R.O.Studer, P.Lanz, Helv.chim.Acta 43, 1751 (1960)
R.O.Studer, K.Vogler, Helv.chim.Acta 44, 131 (1961)
- 4) Vgl. J.R.Weisiger, W.Hausmann, L.C.Craig, J.Amer.chem.Soc. 77, 3123 (1955)
I.M.Lockhart, E.P.Abraham, G.G.F.Newton, Biochem.J. 61, 534 (1955)
- 5) R.Schwyzer et al., Helv.chim.Acta 39, 872 (1956)
- 6) T.Emery, J.B.Neilands, J.Amer.chem.Soc. 83, 1626 (1961)
- 7) W.Keller-Schierlein, A.Deér, Helv.chim.Acta 46, 1907 (1963)
- 8) A.P.Ryle, F.Sanger, L.F.Smith, R.Kitai, Biochem.J. 60, 541 (1955)
- 9) V.du Vigneaud et al., J.Amer.chem.Soc. 76, 3115 (1954)
R.L.Huguenin, R.A.Boissonnas, Helv.chim.Acta 44, 213 (1961)
- 10) V.du Vigneaud et al., J.Amer.chem.Soc. 76, 4751 (1954)
- 11) A.Stoll, A.Hofmann, Th.Petrzilka, Helv.chim.Acta 34, 1545 (1951)
- 12) H.Brockmann, Angew.Chem. 67, 751 (1955)
- 13) H.Brockmann, Angew.Chem. 68, 66 (1956)
- 14) Th.Wieland, W.Schön, Liebigs Ann.Chem. 593, 157 (1955)
- 15) F.Sanger, Adv.Prot.Chem. VII, 1 (1952)
- 16) Vgl. "Polyamino Acids, Polypeptides and Proteins",
Hrsgb. M.A.Stahmann, The University of Wisconsin Press (1963)
- 17) H.Brockmann, H.Tummes, F.A.v.Metzsch, Naturw. 41, 37 (1954)
- 18) R.A.Boissonnas, I.Schumann, Helv.chim.Acta 35, 2229 (1958)

XI. Literaturverzeichnis

- 19) M. Winitz, J.S. Fruton, J.Amer.chem.Soc. 75, 3041 (1953)
- 20) J.C. Sheehan, W.L. Richardson, J.Amer.chem.Soc. 76, 6329
(1954)
- 21) J.C. Sheehan, M. Goodman, W.L. Richardson, J.Amer.chem.Soc.
77, 6391 (1955)
- 22) D.G.H. Ballard, C.H. Bamford, F.J. Weymouth, Nature (London)
174, 173 (1954)
- 23) C.H. Bamford, F.J. Weymouth, J.Amer.chem.Soc. 77, 6368 (1955)
- 24) D.G.H. Ballard, C.H. Bamford, F.J. Weymouth, Proc. Roy. Soc.
(London) A. 227, 155 (1955)
- 25) L. Bilek, J. Derkosch, H. Michl, F. Wessely, Monatsh. 84, 717
(1953)
- 26) G.W. Kenner, J.M. Turner, Chem. and Ind. 602 (1955)
- 27) R. Schwyzer, P. Sieber, Angew. Chemie 68, 518 (1956)
- 28) R. Schwyzer, P. Sieber, Helv. chim. Acta 40, 624 (1957)
- 29) R. Schwyzer, P. Sieber, Helv. chim. Acta 41, 1582 (1958)
- 30) R. Schwyzer, B. Gorup, Helv. chim. Acta 41, 2193 (1958)
- 31) Th. Wieland, K.W. Chly, Annalen 605, 179 (1957)
- 32) M. Rothe, H. Brünig, G. Eppert, J. prakt. Chem. 8 (4), 321 (1959)
- 33) M. Rothe, Acta Chim. Acad. Sci. Hung. 18, 449 (1959)
- 34) Th. Wieland, B. Heinke, Annalen, 615, 18- (1958)
- 35) R. Schwyzer, P. Sieber, B. Gorup, Chimia 12, 90 (1958)
- 36) R. Schwyzer, P. Sieber, Helv. chim. Acta 41, 2190 (1958)
- 37) M. Rothe, J. Rothe, H. Brünig, K.O. Schwenke, Angew. Chemie
71, 700 (1959)
- 38) W. Lautsch u. Mitarb., Chimia 13, 129 (1959)
- 39) R. Shingte, Diss. F.U. Berlin (1960)
- 40) H. Raubut, Diss. F.U. Berlin (1960)
- 41) D. Heinicke, Diss. F.U. Berlin (1960)
- 42) R. Schwyzer, B. Gorup, Angew. Chemie 72, 270 (1960)

XI. Literaturverzeichnis

- 43) M.Rothe, Angew.Chemie 72, 342 (1960)
- 44) R.Schwyzer, P.Sieber, Helv.chim.Acta 43, 1910 (1960)
- 45) W.Stoffel, L.C.Craig, J.Amer.chem.Soc. 83, 145 (1961)
- 46) K.Vogler, R.O.Studer, P.Lang, W.Lergier, E.Böhni, Experientia 17, 223 (1961)
- 47) H.Wieczorek, Diplomarbeit F.U.Berlin (1961)
Diss. F.U.Berlin (1964)
- 48) R.D.Kopple, D.E.Nitecki, J.Amer.chem.Soc. 83, 4103 (1961)
- 49) R.Schwyzer, A.Tun-Kyi, Helv.chim.Acta 45, 859 (1962)
- 50) W.Lautsch u.Mitarb., Kolloid-Z. 181, 115 (1962)
183, 38 (1962)
- 51) J.C.Sheehan, D.N.McGregor, J.Amer.chem.Soc. 84, 3000 (1962)
- 52) G.Schreiber, Diss. F.U.Berlin (1962)
- 53) H.Brockmann, M.Springorum, Naturw. 49, 514 (1962)
- 54) H.Brockmann, V.Graef, Z.f.Naturforsch. 17a, 540 (1962)
- 55) K.D.Kopple, D.E.Nitecki, J.Amer.chem.Soc. 84, 4457 (1962)
- 56) R.O.Studer, W.Lergier, K.Vogler, Helv.Chim.Acta 46, 612
(1963)
- 57) K.D.Kopple, R.R.Jorabak, Biochemistry 2, 958 (1963)
- 58) M.Rothe, I.Rothe, K.D.Steffen, Angew.Chemie 75, 1206 (1963)
- 59) W.Grimm, Diss. F.U.Berlin (1964)
- 60) W.Schreiber, Diss. F.U.Berlin (1964)
- 61) R.Schwyzer et al., Helv.chim.Acta 47, 441 (1964)
- 62) H.Gerlach, J.A.Owtschinnikow, V.Prelog, Helv.chim.Acta 47,
2294 (1964)
- 63) G.M.J.Schmidt, D.C.Hodgkin, B.M.Oughton, Biochem.J. 65,
744 u. 752 (1957)
- 64) R.Schwyzer, Rec.chem.Prog. 20 Nr.3, 147 (1959)
(Kresge-Hooker Science Library Ass.)
- 65) D.T.Warner, Nature 190, 120 (1961)

XI. Literaturverzeichnis

- 66) W.Lautsch, Kolloid-Z. 166, 55 u. 167, 144 (1959)
- 67) H.Rauhut u. W.Lautsch, Angew.Chem. 73, 32 (1961)
- 68) W.Lautsch u. H.J.Kraege, Chem.Ber. 89, 737 (1956)
- 69) H.J.Kraege, Diss. F.U.Berlin (1958)
- 70) G.Schulz, Diss. F.U.Berlin (1958)
- 71) D.Günther, Diss. F.U.Berlin (1958)
- 72) J.Gante, Diplomarbeit F.U.Berlin (1959)
- 73) W.Bandel, Diss. F.U.Berlin (1960)
- 74) M.Rimpler, Diss. F.U.Berlin (1961)
- 75) W.Kamm, Diss. F.U.Berlin (1964)
- 76) "Proceedings of a Conference on Rotatory Dispersion"
in Tetrahedron 13, (1961)
- 77) P.Urnes, P.Doty, Adv.Prot.Chem. 16, 401 (1961)
- 78) E.R.Blout in "Optical Rotatory Dispersion", Hersg.C.Djerassi
McGraw-Hill-Book Co., New Yorck-Toronto-London 1960, 238.
- 79) G.Amiard, R.Heymes, L.Velluz, Bull.Soc.chim.France
1955, 191
- 80) L.Zervas, D.M.Theodoropoulos, J.Amer.chem.Soc. 78, 1359
(1956)
- 81) R.A. Boissonnas, Helv.chim.Acta 34, 874 (1951)
- 82) R.Schwyzer, B.Iselin, M.Feurer, Helv.chim.Acta 38, 69 (1955)
- 83) A.R.Battersby, L.C.Craig, J.Amer.chem.Soc. 74, 4023 (1952)
- 84) R.Schwyzer, P.Sieber, Helv.chim.Acta 41, 2186 (1958)
- 85) E.Stahl, Dünnschichtchromatographie S.418, 497, Springer-
Verl.Wien 1962
- 86) B.F.Erlanger, E.Brand, J.Amer.chem.Soc. 73, 3508 (1951)
- 87) H.G.Leemann, Chimia 14, 1 (1960)
H.G.Leemann, K.Stich, Chimia 17, 183 (1963)

XI. Literaturverzeichnis

- 88) M.F.Perutz, Nature 167, 1053 (1951)
- 89) C.H.Bamford, W.E.Hanby, F.Happey, Proc.Roy.Soc.London
A 205, 31 (1951)
- 90) C.H.Bamford, L.Brown, A.Elliott, W.E.Hanby, I.F.Trotter,
Nature 169, 357 (1952)
- 91) C.H.Bamford, L.Brown, A.Elliott, W.E.Hanby, I.F.Trotter,
Proc.Roy.Soc.B 141, 49 (1953)
- 92) C.H.Bamford, A.Elliott, W.E.Hanby "Synthetic Polypeptides",
Academic Press. New York (1956)
- 93) A.Elliott, E.Bradbury, A.R.Downie, W.E.Hanby in (16) S.258
- 94) L.Pauling, R.B.Corey, Proc.Nat.Acad.Sci. US 37, 235, 241,
729 (1951)
- 95) L.Pauling, R.B.Corey, H.R.Branson, Proc.Nat.Acad.Sci. US
37, 205 (1951)
- 96) P.Drude, Lehrbuch der Optik, 2.Aufl., S.Hirzel-Verl.Leipzig
1906
- 97) T.M.Lowry, Trans.Farad.Soc. 26, 267 (1930)
- 98) W.Kuhn in K.Freudenberg "Stereochemie" Kap.VIII, Verl.Franz
Deuticke, Leipzig, Wien 1933
- 99) J.T.Yang, P.Doty, J.Amer.chem.Soc. 79, 761 (1957)
- 100) P.Doty, J.T.Yang, J.Amer.chem.Soc. 78, 498 (1956)
- 101) W.Moffitt, J.T.Yang, Proc.Nat.Acad.Sci. US 42, 596 (1956)
- 102) W.Moffitt, Proc.Nat.Acad.Sci.US 42, 736 (1956)
- 103) W.Moffitt, J.chem.Phys. 25, 467 (1956)
- 104) W.Moffitt, D.D.Fitts, J.G.Kirkwood, Proc.Nat.Acad.Sci.US
43, 723 (1957)
- 105) D.D.Fitts, J.G.Kirkwood, Proc.Nat.Acad.Sci.US 42, 33 (1956)
- 106) C.Cohen, A.Szent-Györgyi, J.Amer.chem.Soc. 79, 248 (1957)
- 107) D.D.Fitts, J.G.Kirkwood, J.Amer.chem.Soc. 78, 2650 (1956)
- 108) A.R.Downie, A.Elliott, W.E.Hanby, Nature 183, 110 (1959)
- 109) J.D.Coombes, E.Katchalski, P.Doty, Nature 185, 534 (1960)
- 110) E.Katchalski, M.Seia, J.Amer.chem.Soc. 75, 5284 (1953)

XI. Literaturverzeichnis

- 111) E.M.Bradbury, L.Brown, A.R.Downie, A.Elliott, W.E.Hanby,
T.R.R.McDonald, Nature 183, 1736 (1959)
- 112) J.Strem, Y.S.R.Krishna-Prasad, J.A.Schellman in (79),
S.176.
- 113) C.G.Schellman, J.A.Schellman, Compt.rend. trav.lab.
Carlsberg, Ser.chim.30, 363 (1958)
- 114) M.Goodmann in (16), Paper 17
- 115) M.Goodmann, E.E.Schmitt, D.Yphantis, J.Amer.chem.Soc.82,
3483 (1960)
- 116) E.R.Blout, Proc. 4th Intern.Congr.Biochem.,Vienna VIII,
37 (1958)
- 117) E.Katchalski, Proc. 4thIntern.Congr.Biochem.Vienna VIII,
21 (1958)
- 118) N.B.Abbott, E.J.Ambrose, Proc.Roy.Soc.,London 219 A,
17 (1953)
- 119) E.J.Ambrose, A. Elliott, Proc.Roy.Soc. 205 A, 47 (1951)
- 120) W.Brügel "Einführung in die Ultrarotspektroskopie"
Verlag Dr.D.Steinkopff,Darmstadt (1962)
- 121) R.Huisgen et al., Chem.Ber. 90, 1437 (1957)
- 122) Org.Synth.Coll.Vol.II, 310
- 123) E.Fischer, Ber. dtsh.chem.Ges. 34, 451 (1901)
- 124) R.B.Corey, J.Donohue, J.Amer.chem.Soc. 72, 2899 (1950)

L e b e n s l a u f

Ich wurde am 29. Juni 1933 als Tochter des o. Professors Dr.Theodor Bödefeld und seiner Frau Irmgard geb. Geck in Karlsruhe geboren.

Von April 1940 bis März 1943 besuchte ich die Volksschule in München, 1943-1944 die Deutsche Schule in Istanbul. Im Herbst 1946 trat ich in die "Maria-Ward-Oberrealschule der Englischen Fräulein" in München ein. Dort machte ich im Juli 1952 das Abitur.

Ich begann das Chemiestudium im Wintersemester 1952/53 an der Technischen Universität Berlin, wechselte 1954 an die Universität in München über, legte dort im Mai 1956 die Vordiplom-Prüfung ab und setzte danach mein Studium an der Freien Universität Berlin fort. Die Diplom-Prüfung bestand ich im Juli 1959 mit "sehr gut", nachdem ich unter Leitung von Professor Dr.W.Lautsch meine Diplomarbeit "Synthese und Untersuchungen über den Radikalcharakter des Mesohämin-IX-bis-(L-histidyl-L-tyrosin)" angefertigt hatte.

Von Juni 1958 bis September 1959 war ich wissenschaftliche Hilfskraft, seit Oktober 1959 bin ich wissenschaftliche Assistentin am Institut für Organische Chemie der Freien Universität Berlin.

